

Vera de Freitas Ayres Meloni

**SÍNDROME DA DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 18: AVALIAÇÃO CLÍNICA E
CITOGENÔMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2016

Vera de Freitas Ayres Meloni

**SÍNDROME DA DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 18: AVALIAÇÃO CLÍNICA E
CITOGENÔMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Isabel de Souza
Aranha Melaragno

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Beatriz Carvalho
Costa-Tavares

São Paulo

2016

Meloni, Vera de Freitas Ayres

Síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 18: Avaliação clínica e citogenômica./ Vera de Freitas Ayres Meloni. -- São Paulo, 2016.
xxi, 200 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Título em Inglês: Chromosome 18p deletion syndrome: Clinical and cytogenomic characterisation.

1. Cromossomos, humano, par 18. 2. Cromossomos, deleção. 3. Cromossomos, anel. 4. Hibridação *in situ*, fluorescente. 5. Análise de sequência de oligonucleotídeos por array. 6. Síndrome de deficiência imunológica. 7. Deficiência intelectual.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional

Chefe da Disciplina de Genética:

Prof.^a Dr.^a Janete Maria Cerutti

Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:

Prof. Dr. Luís Garcia Alonso

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação:

Prof.^a Dr.^a Sintia Iole Nogueira Belangero

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Reitora: Prof.^a Dr.^a Soraya Soubhi Smaili

Vice-reitora: Prof.^a Dr.^a Valeria Petri

Chefe de Gabinete: Prof.^a Dr.^a Maria José da Silva Fernandes

Vera de Freitas Ayres Meloni

**SÍNDROME DA DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 18: AVALIAÇÃO CLÍNICA E
CITOGENÔMICA**

Presidente da banca: Prof.^a Dr.^a. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Garcia Alonso

Prof.^a Dr.^a Antonia Paula Marques de Faria

Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Jornada Krebs

Prof.^a Dr.^a Fernanda Teresa de Lima

Aprovada em: 14/03/2016

DEDICATÓRIA

Aos meus amores Ulisses, Renato e Marcos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Maria Francisca e Waldomiro** (*in memoriam*) pelo exemplo de vida dedicada aos filhos, à família e ao trabalho. Ao meu pai, incentivador e médico dedicado, por me ensinar a ser curiosa e a ouvir com cuidado os pacientes.

Ao meu esposo, meu amor, amigo, colega de profissão, incentivador e companheiro de longa jornada, **Ulisses**, que está ao meu lado todos os dias, que me ensinou a ser mais generosa e amável com tudo e com todos, que acredita em mim e não me deixa desanimar.

Aos meus filhos, **Renato e Marcos**, meus heróis e amores incondicionais, que me ensinam a trilhar o caminho do futuro sem medo de experimentar o novo com confiança e alegria no amanhã, seja lá o quê nos espere.

Às minhas norinhas, **Ana Luiza e Camila**, pelo carinho, cuidado e atenção para comigo.

Aos meus sogros, **Leandro e Orminda**, pelo carinho e incentivo incondicionais.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e sobrinhas-netas **Luiz, Thaïs, Fernando, Eliane** (*in memoriam*), **Eliana, Denise, Newton, Daniel, Heloisa, Marina, Deborah, Bruna, João Maurício, João Marcelo, Aline, Klaus, Alice, Clara e Sarah**, família muito querida.

Às minhas queridas amigas **Marcela Monteiro, Fernanda Lima, Flavia Piazzon, Maria de Fátima Faria e Nair Tanno**, queridas sempre, profissionais competentes e dedicadas, cada uma em sua área, e que estiveram ao meu lado durante todo o processo deste trabalho ajudando e apoiando nos momentos mais difíceis.

Aos professores **Dr^a Claudette Hajaj Gonzalez e Dr Decio Brunoni** por sua influência e incentivo no direcionamento de minha carreira para a Genética Médica.

Aos amigos da Disciplina de Genética, **Bel, Gi, Janete, Marizinha, Roberta, Anelisa, Sylvinha, Marquinhos, Carol Muniz, Adriana Battista, Van, Pat, Letícia, Mileny, Andréa, Adriana Bortolai, Luiza, Mariana, Leniza, Malú, Leo, Fe Wiz, Mara, Cleide, Lilian, Carol Giguek e Betty**, pelos momentos de descontração e por estarem sempre disponíveis para tirar as minhas dúvidas, por todo o apoio técnico e psicológico.

A todos os **amigos, residentes e funcionários** do Centro de Genética Médica da UNIFESP, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Genética, **Leo, Sylvinha, Mara, Lilian e Cleide**, pelas funções imprescindíveis para a realização do trabalho de todos na Disciplina de Genética.

Aos Professores da Disciplina de Genética **Dr^a Maria Isabel Melaragno, Dr^a Marília de Arruda Cardoso Smith, Dr^a Janete Maria Cerutti, Dr^a Sintia Iole Nogueira Belangero, Dr^a Gianna Maria Griz Cavalleira e Dr^a Elizabeth Sushi Chen** pelo exemplo de docência e pesquisa acadêmica.

Aos Professores **Dr^a Leslie Domenici Kulikowski, Dr^a Gianna Maria Griz Carvalheira, Dr Luís Garcia Alonso e Dr^a Fernanda Teresa de Lima** pelo incentivo, orientação, correções e conselhos ao participarem das Bancas de Qualificação de progressão de Mestrado e de Doutorado e, principalmente, por acreditarem no meu trabalho.

Aos colegas, **Dr Decio Brunoni, Dr^a Ana Beatriz Alvarez Perez, Dr Marco Antonio de Paula Ramos, Dr^a Chong Ae Kim, Dr^a Ana Luiza Pilla Luce e Dr^a Fernanda Teresa de Lima**, por terem cedido seus pacientes para esse estudo.

Às neuropsicólogas, **Dr^a Claudia Berlim de Mello, Larissa Salustiano Evangelista Pimenta e Luciana Mello di Benedetto**, por terem realizado as avaliações neuropsicológicas. Em especial à **Claudia** companheira de viagem ao encalço dos pacientes que não compareciam ao ambulatório.

À **Dr^a Maria de Fátima Soares de Faria**, por ter avaliado e interpretado os exames de imagem.

À **Banca examinadora**, pelas correções e conselhos na etapa final deste projeto.

Aos **pacientes** e seus **familiares** que concordaram em participar desse estudo e em especial ao **Lucas**, por ter sido o paciente que inspirou esse trabalho.

À minha coorientadora, **Prof^a Dr^a Beatriz Carvalho Costa Tavares**, por sua atenção, paciência, orientação e dedicação a mim e aos pacientes desse trabalho.

À minha orientadora, **Prof^a Dr^a Maria Isabel Melaragno**, por depositar confiança e apostar em mim e no meu trabalho, incentivar e valorizar o trabalho de todos os profissionais a sua volta com entusiasmo e dedicação incondicionais aos seus alunos. Bel, agora que chegamos ao final do longo caminho que trilhamos juntas, saiba que não tenho como agradecer o quanto aprendi, não só de genética humana, mas de vida, amizade sincera e exemplo de professora e pesquisadora dedicada. Espero que possamos continuar a trilhar novos caminhos juntas aprendendo e ensinando. Muito obrigada por tudo!

EPÍGRAFE

“O improvável não é impossível”.

Pedro Werneck

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu Auxílio à Pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2010/50737-1): “Investigação de indivíduos com alterações cromossômicas e genômicas: busca por genes relevantes para o fenótipo”.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
EPÍGRAFE	ix
AUXÍLIO FINANCEIRO.....	x
SUMÁRIO.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
RESUMO.....	xxi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo geral.....	4
1.1.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 18.....	6
2.1.1 Epidemiologia	6
2.1.2 Características clínicas	6
2.1.3 Caracterização citogenética.....	11
2.1.4 Caracterização gênica da região do braço curto do cromossomo 18.....	11
2.2 Síndrome do Cromossomo 18 em Anel	17
2.2.1 Epidemiologia	17
2.2.2 Caracterização citogenética.....	17
2.2.3 Características clínicas	18
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1 Casuística	21
3.2 Metodologia	21
3.2.1 Avaliação Clínica	21
3.2.1.1 Definição do protocolo de investigação	21
3.2.1.2 Avaliação Clínica da Amostra.....	22
3.2.1.3 Avaliação Neuropsicológica	22
3.2.1.4 Avaliação da Imunidade Humoral.....	23
3.2.1.5 Avaliação Radiológica	24
3.2.4 Avaliação Citogenômica	24
3.2.4.1 Coleta do material e obtenção de DNA.....	24
3.2.4.2 Citogenética Clássica	24
3.2.4.3 Estudo molecular por meio de array.....	24
3.2.4.4 FISH-BAC para validação dos resultados de array	25
3.2.5 Correlação genótipo/fenótipo.....	25
3.2.6 Análise dos dados.....	25
3.2.6.1 Tabulação de dados	25
3.2.6.2 Análise dos dados.....	25
4.1 Caracterização da amostra.....	27
4.2 Estudo clínico.....	27
4.2.1 Descrição clínica dos pacientes com deleção pura (Grupo I).....	28
4.2.1.1 Paciente 1: A.C.P.I.	28
4.2.1.2 Paciente 2: D.A.B.....	29
4.2.1.3 Paciente 3: M.L.S.	30
4.2.1.4 Paciente 4: L.B.L.....	32
4.2.1.5. Paciente 5: V.H.H.P.L.....	33
4.2.2 Descrição clínica dos pacientes com anel do cromossomo 18 (Grupo II).....	34

4.2.2.1 Paciente 6: T.A.S.....	34
4.2.2.2 Paciente 7: J.D.A.B.	35
4.2.3 Descrição clínica dos pacientes com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo (Grupo III).....	36
4.2.3.1 Paciente 8: D.S.N.	36
4.2.3.2 Paciente 9: S.G.F.....	38
4.2.3.3 Paciente 10: J.M.S.....	39
4.2.3.4 Paciente 11: R.V.S.	40
4.2.3.5 Paciente 12: P.L.S.	41
4.3 Avaliação radiológica.....	46
4.4 Avaliação Neuropsicológica	46
4.5 Avaliação imunológica.....	51
4.6 Avaliação Citogenética e Molecular	53
4.6.1 Pacientes com deleção pura (Grupo I)	53
4.6.1.1 Paciente 1: A.C.P.I.	53
4.6.1.2 Paciente 2: D.A.B.....	54
4.6.1.3 Paciente 3: M.L.S.....	55
4.6.1.4 Paciente 4: L.B.L.....	55
4.6.1.6 Paciente 5: V.H.H.P.L.....	56
4.6.2 Pacientes com anel do cromossomo 18 (grupo II)	56
4.6.2.1 Paciente 6: T.A.S.....	56
4.6.2.2 Paciente 7: J.D.A.B.	57
4.6.3 Pacientes com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo (Grupo III) ...	58
4.6.3.1 Paciente 8: D.S.N.	58
4.6.3.3 Paciente 10: J.M.S.....	60
4.6.3.4 Paciente 11: R.V.S.	61
4.6.1.5 Paciente 12: P.L.S.	63
4.7 Avaliação Comparativa dos dados clínicos e citogenômicos.....	67
4.8 Recomendações sugeridas para a avaliação e seguimento clínico de pacientes com deleção 18p.....	73
5. DISCUSSÃO	78
5.1 Caracterização citogenética das deleções 18p.....	78
5.2 Caracterização clínica dos pacientes com deleção 18p: Tabulação e Análise dos dados.....	80
5.2.1 Alterações neurológicas	82
5.2.2 Malformações cardíacas.....	85
5.2.3 Alterações ortopédicas	86
5.2.4 Alterações genito-urinárias	86
5.2.5 Alterações gastrointestinais.....	87
5.2.6 Anomalias oftalmológicas.....	87
5.2.7 Deficiência auditiva.....	87
5.2.8 Alterações endocrinológicas	88
5.2.9 Alterações dermatológicas	89
5.2.10 Dismorfologia	90
5.2.11 Avaliação neuropsicológica	98
5.2.12 Alterações imunológicas	102
5.2.13 Recomendações para a avaliação e seguimento clínico de pacientes com deleção 18p.....	105
5.2.14 Limitações do trabalho	106
5.3 Considerações finais.....	107
6. CONCLUSÕES.....	109
7. ANEXOS	112
ANEXO 1 - Aprovação do comitê de ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP	112
ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido	113
ANEXO 3 - Protocolo clínico	115
ANEXO 4 - Quadro 2	120
ANEXO 5 - Quadro 3	121

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8.1 Referências bibliográficas	123
8.2 Base de dados na internet	132
ABSTRACT	134
APÊNDICES	136
1 Publicações relacionadas aos pacientes da tese.....	136
Apêndice 1 Spreiz et al., 2013.....	137
Apêndice 2 Guilherme et al., 2011.....	144
Apêndice 3 Guilherme et al., 2014.....	151
2 Publicações realizadas durante o período da tese como primeiro autor	159
Apêndice 4 Meloni et al., 2012.	160
Apêndice 5 Meloni et al, 2014.	161
Apêndice 6 Meloni et al., 2014.	162
Apêndice 7 Meloni et al., 2015.	163
3 Outras Publicações realizadas durante o período da tese	164
Apêndice 8 Sodré et al., 2010.	166
Apêndice 9 Guilherme et al., 2010.....	167
Apêndice 10 Christofolini et al., 2012	168
Apêndice 11 Guilherme et al., 2012.....	169
Apêndice 12 Guilherme et al., 2013.....	170
Apêndice 13 Oliveira et al., 2014.....	171
Apêndice 14 Carvalheira et al., 2014	172
Apêndice 15 Moysés-Oliveira et al., 2015	173
Apêndice 16 Moysés-Oliveira et al., 2015	174
4 Publicações aceitas	176
GLOSSÁRIO	178
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	180

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fenótipos relacionados à região 18p	14
Figura 2	Genes localizados no braço curto do cromossomo 18 com código de cores em relação à sensibilidade à dose.....	15
Figura 3	Representação gráfica do braço curto do cromossomo 18 e os genes mais importantes da região.....	16
Figura 4	Fotos da paciente 1.....	29
Figura 5	Fotos da paciente 2.....	30
Figura 6	Fotos da paciente 3.....	31
Figura 7	Fotos do paciente 4.....	33
Figura 8	Fotos do paciente 5.....	34
Figura 9	Fotos da paciente 6.....	35
Figura 10	Fotos do paciente 7.....	36
Figura 11	Foto do paciente 8.....	37
Figura 12	Foto do paciente 9.....	38
Figura 13	Fotos do paciente 10.....	40
Figura 14	Fotos da paciente 11.....	41
Figura 15	Foto do paciente 12.....	42
Figura 16	Representação gráfica da tabela 9.....	53
Figura 17	Cariótipo parcial sob bandamento G da paciente 1, do pai da paciente 1 e <i>array</i> genômico parcial dos cromossomos 18 e 8 da paciente 1.....	54
Figura 18	Cariótipo parcial sob bandamento G e <i>array</i> genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 2.....	54
Figura 19	Cariótipo parcial sob bandamento G e <i>array</i> genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 3.....	55
Figura 20	Cariótipo parcial sob bandamento G e <i>array</i> genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 4.....	55
Figura 21	Cariótipo parcial sob bandamento G e <i>array</i> genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 5.....	56
Figura 22	Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e <i>array</i> genômico da paciente 6.....	57
Figura 23	Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e <i>array</i> genômico da paciente 7.....	57
Figura 24	Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e <i>array</i> genômico parcial do paciente 8.....	59
Figura 25	Cariótipos parciais por bandamento G do paciente 9 e de sua mãe e <i>array</i> genômico parcial do paciente 9.....	60
Figura 26	Cariótipos parciais por bandamento G do paciente 10 e de sua mãe, por método de FISH e <i>array</i> genômico do paciente 10.....	61
Figura 27	Cariótipos parciais por bandamento G do paciente 10 e de sua mãe, por método de FISH e <i>array</i> genômico do paciente 11.....	62
Figura 28	Heredograma simplificado da família dos pacientes 10 (III-3) e 11 (III-4).	63

Figura 29	Cariótipo parcial por bandamento G e <i>array</i> genômico parcial do cromossomo 18 e do cromossomo 21 do paciente 12.....	64
Figura 30	Vista facial frontal dos pacientes com pontos de quebra em 18p11.21.....	67
Figura 31	Vista facial frontal dos pacientes com pontos de quebra em 18p11.23.....	68
Figura 32	Região deletada compartilhada por todos os pacientes da amostra (chr18: 1-1,385,430).....	69
Figura 33	Gráfico comparativo dos segmentos cromossômicos alterados dos pacientes da amostra.....	70
Figura 34	Comparação dos índices de quociente de inteligência dos pacientes que apresentaram deleção com ponto de quebra em 18p11.21 e 18p11.23.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência das manifestações clínicas na deleção 18p completa.....	10
Tabela 2	Coordenadas referentes às regiões críticas para o fenótipo deleção 18p (hg19).....	16
Tabela 3	Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo I.....	43
Tabela 4	Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo II.....	44
Tabela 5	Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo III.....	45
Tabela 6	Avaliação neuropsicológica realizada nos pacientes com a medida de desempenho intelectual, escala de habilidades adaptativas e comportamentais.....	48
Tabela 7	Resultados da avaliação das habilidades adaptativas da presente amostra conforme índices globais (escore padrão) e subdomínios (nota ponderada) obtidos na escala Vineland II.....	49
Tabela 8	Problemas comportamentais na amostra de pacientes com deleção 18p, conforme resultados no inventário CBCL (em t-escore).....	50
Tabela 9	Dosagem de Imunoglobulinas séricas dos pacientes.....	52
Tabela 10	Cariótipo por bandamento G dos pacientes e de seus pais.....	65
Tabela 11	Resultados da avaliação por FISH.....	65
Tabela 12	Resultadodo array dos pacientes.....	66
Tabela 13	Pontos de quebra no braço curto do cromossomo 18 encontrados nos pacientes da amostra.....	66
Tabela 14.	Desequilíbrios genômicos dos pacientes 8, 9, 10, 11 e 12 associados à deleção 18p, tamanho da alteração cromossômica, alguns genes da região e fenótipos relacionados a esses genes.....	68
Tabela 15.	Avaliação neuropsicológica dos pacientes que apresentaram deleção 18p11.21 e 18p11.23.....	71
Tabela 16.	Doenças em que a base molecular é conhecida e os genes estão localizados no braço curto do cromossomo 18.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Resumo das recomendações para o seguimento de pacientes com deleção 18p.....76

Quadro 2 Resumo das características clínicas, idiogramas dos cromossomos envolvidos e principais genes deletados nos pacientes do Grupo I (Anexo 4)120

Quadro 3 Resumo das características clínicas, idiogramas dos cromossomos envolvidos e principais genes deletados e duplicados nos pacientes dos Grupos II e III (Anexo 5).....121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviaturas dos nomes de genes e proteínas

<i>ADCYAP1</i>	<i>Homo sapiens adenylate cyclase activating polypeptide 1</i>
<i>AFG3L2</i>	<i>Homo sapiens AFG3 ATPase family member 3-like 2</i>
<i>ANKRD12</i>	<i>Homo sapiens ankyrin repeat domain 12</i>
<i>APCDD1</i>	<i>Homo sapiens adenomatosis polyposis coli down-regulated 1</i>
<i>CETN1</i>	<i>Homo sapiens centrin, EF-hand protein, 1</i>
<i>CNTNAP3</i>	<i>Homo sapiens contactin associated protein-like 3</i>
<i>CYBA</i>	<i>Homo sapiens cytochrome b-245, alpha polypeptide</i>
<i>CYB5A</i>	<i>Homo sapiens cytochrome b5 type A</i>
<i>DLGAP1</i>	<i>Discs-large associated protein 1</i>
<i>DMRT1</i>	<i>Homo sapiens doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
<i>DMRT2</i>	<i>Homo sapiens doublesex and mab-3 related transcription factor 2</i>
<i>EMILIN2</i>	<i>Elastin microfibril interfacer 2</i>
<i>EPB41L3</i>	<i>Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3</i>
<i>FGFR3</i>	<i>Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>FOXF1</i>	<i>Homo sapiens forkhead box F1 Homo sapiens forkhead box F1</i>
<i>FBXO31</i>	<i>Homo sapiens F-box protein 31</i>
<i>GNAL</i>	<i>Guanine nucleotide binding protein-G protein</i>
<i>GKAP1</i>	<i>Homo sapiens G kinase anchoring protein 1</i>
<i>IRF1</i>	<i>Homo sapiens interferon regulatory factor 1</i>
<i>IRF2</i>	<i>Homo sapiens interferon regulatory factor 2</i>
<i>IRF8</i>	<i>Homo sapiens interferon regulatory factor 8</i>
<i>IL17C</i>	<i>Homo sapiens interleukin 17C</i>
<i>ISGF3</i>	<i>Interferon-Stimulated Transcription Factor 3, Gamma</i>
<i>LAMA1</i>	<i>Laminin, Alpha 1</i>
<i>LPIN2</i>	<i>Homo sapiens lipin 2, mRNA</i>
<i>MC2R</i>	<i>Melanocortin 2 Receptor</i>
<i>MC5R</i>	<i>Homo sapiens melanocortin 5 receptor, mRNA</i>
<i>MRLC3</i>	<i>Myosin regulatory light chain-3</i>
<i>MSX2</i>	<i>Homo sapiens msh homeobox 2</i>
<i>MYOM1</i>	<i>Myomesin 1</i>
<i>MYL12B</i>	<i>Myosin, light chain 12B</i>
<i>NSD1</i>	<i>Homo sapiens nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
<i>NDUFV2</i>	<i>Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2</i>
<i>PAX5</i>	<i>Paired box 5</i>
<i>PIEZO2</i>	<i>Homo sapiens piezo-type mechanosensitive ion channel component 2</i>
<i>POTED</i>	<i>POTE Ankyrin Domain Family, Member D</i>
<i>PSIP1</i>	<i>Transcriptional Coactivator P75/P52</i>
<i>PTPN2</i>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 2</i>
<i>RARS2</i>	<i>Homo sapiens arginil-tRNA synthetase 2</i>

<i>SIGMAR1</i>	<i>Sigma non-opioid intracellular receptor 1)</i>
<i>SMCHD1</i>	<i>Homo sapiens structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1</i>
<i>TGIF</i>	<i>Transforming growth factor-beta induced factor</i>
<i>TGIF1</i>	<i>TGFB-induced factor homeobox 1</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i>
<i>THOC1</i>	<i>THO complex 1</i>
<i>TPTE</i>	<i>Transmembrane Phosphatase With Tensin Homology</i>
<i>TSHZ1</i>	<i>Homo sapiens teashirt zinc finger homeobox 1</i>
<i>TWSG1</i>	<i>Twisted gastrulation homolog 1</i>
<i>USP14</i>	<i>Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 14</i>
<i>ZFP161</i>	<i>Zinc Finger And BTB Domain Containing 14</i>

RESUMO

Objetivo: Avaliar uma amostra de pacientes com deleção 18p, sob os aspectos clínicos e citogenômicos a fim de aprimorar a correlação genótipo-fenótipo. **Métodos:** Os pacientes foram avaliados por meio de protocolo clínico específico, desenvolvido a partir da revisão da literatura, e de avaliações imunológica e neuropsicológica. Uma planilha de dados foi criada no programa Microsoft Excel com os achados clínicos, exames complementares, citogenômicos e avaliações neuropsicológica e imunológica para facilitar a realização da correlação genótipo-fenótipo. O estudo citogenômico foi realizado por cariotipagem sob bandamento G, técnicas de *array* genômico e de FISH (do inglês, *Fluorescent In Situ Hybridization*). **Resultados e Conclusões:** Foram estudados 12 pacientes diagnosticados previamente com deleção 18p, sendo sete do sexo masculino e cinco do sexo feminino. Os pacientes foram classificados em três grupos em função dos achados citogenômicos encontrados, sendo: cinco com deleção 18p pura (grupo I), dois com cromossomo 18 em anel (grupo II) e cinco com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo (grupo III). Os resultados revelaram grande variação de rearranjos intra e inter-cromossômicos nos pacientes, tanto herdados quanto *de novo*, assim como grande variabilidade de manifestações fenóticas e comorbidades associadas. O estudo por *array* genômico permitiu a determinação mais acurada dos pontos de quebra e uma melhor correlação genótipo-fenótipo. A análise por FISH foi importante para a investigação da presença de translocação equilibrada nos pais dos pacientes. O protocolo clínico associado ao estudo citogenômico dos pacientes proporcionou o reconhecimento de genes relevantes para as manifestações clínicas encontradas tais como o espectro da holoprosencefalia, baixa estatura, queratose pilar, criptorquidia, escoliose e deficiência de IgA. Além disso, esta abordagem multidisciplinar permitiu a criação e proposição de recomendações para a avaliação médica e neuropsicológica de pacientes com deleção 18p, de forma a proporcionar um melhor seguimento clínico e aconselhamento genético adequado para cada família.

Palavras chave: cromossomo 18, deleção 18p, *array*, FISH, protocolo clínico, correlação genótipo-fenótipo.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estudo das alterações cromossômicas estruturais e de sua relação com as manifestações clínicas tem sido beneficiado pela introdução de novas técnicas citogenéticas e moleculares. O diagnóstico dessas alterações tem identificado genes relacionados às manifestações clínicas proporcionando uma melhor correlação genótipo-fenótipo.

A síndrome da deleção 18p (MIM #146390) é uma alteração cromossômica rara na população, porém das mais frequentes entre as alterações estruturais, com mais de 300 pacientes descritos na literatura (Schinzel, 1974; Schinzel, 2001; Schaub et al., 2002; Turleau, 2008; Selbold et al., 2015).

A maioria dos relatos é de casos isolados ou de pequenas amostras de pacientes, sendo escassos na literatura estudos longitudinais descrevendo o curso da doença, descrições de amostras maiores ou estudos com detalhamento dos achados citogenéticos e moleculares. Desta forma, tem sido um grande desafio para os geneticistas clínicos, para outros profissionais da área de saúde e para os pais desses pacientes, terem uma visão geral do prognóstico da doença para o acompanhamento adequado dos mesmos (Soileau et al., 2015). Além disso, os pacientes com deleção 18p apresentam grande variabilidade de manifestações clínicas, intelectuais e comportamentais, geralmente atribuída à heterogeneidade genética da região em hemizigose (Schinzel, 2001; Turleau et al., 2008; Selbold et al., 2015). Outro aspecto importante é que a maioria das caracterizações clínicas e moleculares de pacientes com deleção 18p ocorreu antes da disseminação do uso das análises por técnicas de *array* genômico. Desta forma, a descrição clínica de pacientes, associada à melhor definição do ponto de quebra, tem sido preconizada por vários autores, na tentativa de explicar as manifestações clínicas e relacioná-las aos genes das regiões deletadas (Cody et al., 2009a; Cody et al., 2009b; Selbold et al., 2015).

Citogeneticamente, a deleção 18p pode apresentar-se de diversas formas: deleção pura, anel cromossômico, ou translocações não equilibradas.

Cromossomos 18 em anel [r(18)] foram relatados em cerca de 130 pacientes, sendo que, para a formação dos anéis cromossômicos, ocorrem quebras nos braços curto e longo do cromossomo, com reunião das porções restantes. Nessas situações, os pacientes apresentam, em geral, sinais e sintomas das deleções de ambos os braços cromossômicos (Spreiz et al., 2013).

As síndromes da deleção 18p e do r(18) são em geral diagnosticadas por meio das características clínicas e pelo estudo cromossômico por cariotipagem sob bandamento G,

havendo poucos trabalhos com estudo molecular, bem como poucos trabalhos com pacientes brasileiros (Guilherme et al, 2011; Spreiz et al, 2013; Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015).

No presente trabalho, avaliamos uma amostra de 12 pacientes com deleção 18p caracterizando detalhadamente a síndrome do ponto de vista clínico e citogenômico, possibilitando uma melhor correlação genótipo-fenótipo e a elaboração de recomendações para a avaliação médica e neuropsicológica desses pacientes, resultando em melhor seguimento médico e aconselhamento genético da família.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo de uma amostra de 12 pacientes com deleção 18p do ponto de vista clínico e citogenômico, a fim de proporcionar um melhor diagnóstico aliado a um tratamento mais eficiente para os pacientes com deleção 18p.

1.1.2 Objetivos específicos

1.1.2.1 Elaborar protocolo clínico por meio de revisão dos pacientes descritos na literatura e do estudo genético clínico e citogenético-molecular de indivíduos com deleção 18p, a fim de proporcionar uma avaliação clínica direcionada para as comorbidades associadas à síndrome.

1.1.2.2 Realizar a avaliação clínica dos pacientes, incluindo avaliação neuropsicológica e avaliação da imunidade humoral, segundo o protocolo elaborado.

1.1.2.3 Realizar o estudo citogenômico dos pacientes e de seus familiares, a fim de diagnosticar as alterações citogenômicas e definir com mais acurácia os pontos de quebra.

1.1.2.4 Realizar a correlação genótipo-fenótipo dos pacientes, a fim de melhorar o conhecimento dos genes relacionados com as alterações clínicas observadas.

1.1.2.5 Desenvolver recomendações para o seguimento médico e neuropsicológico preventivo de pacientes com deleção 18p e para o aconselhamento genético e orientação familiar.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 18

As alterações que comprometem o cromossomo 18 em humanos foram descritas no início da década de 60 (Thieffry et al., 1963; de Grouchy et al., 1964). A síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 18 (18p) é uma alteração cromossômica rara e foi o primeiro exemplo de monossomia parcial autossômica compatível com maior sobrevivência. Desde as primeiras descrições, a grande maioria caracteriza-se por relato de casos isolados, principalmente de crianças.

2.1.1 Epidemiologia

Há em torno de 300 pacientes com deleção 18p descritos na literatura, com incidência estimada de 1/50.000 nascidos vivos, porém acredita-se que esta incidência esteja subestimada em função dos pacientes que apresentam somente manifestações menores do espectro clínico e que não são diagnosticados. A síndrome é mais frequentemente descrita no sexo feminino, na razão feminino/masculino de 3:2 (Tsukahara et al., 2001; Maranda et al., 2006; Turleau, 2008; Hasi-Zogaj et al., 2015). As mulheres com deleção 18p podem ser férteis e casos com transmissão familiar da síndrome já foram descritos (Maranda et al., 2006).

2.1.2 Características clínicas

O padrão dismórfico da síndrome nem sempre é observado ao nascimento, tornando-se mais evidente em torno dos três anos de idade (Tsukahara et al., 2001; Wester et al., 2006; Brenk et al., 2007; Recalcati et al., 2010).

O espectro clínico varia entre os pacientes de acordo com o tamanho do segmento cromossômico envolvido. Em geral, os pacientes típicos apresentam baixa estatura e postura característica, com as pernas em base alargada e discreta inclinação do tronco para frente (Turleau, 2008).

O rosto é redondo, plano e inexpressivo, a ponte nasal é plana e larga. Na região ocular observam-se fissuras palpebrais, em geral horizontais com epicanto, hipertelorismo ocular, estrabismo e ptose, que pode ser uni ou bilateral. A boca é grande, o filtro é curto e saliente, as comissuras labiais têm os cantos voltados para baixo. Os dentes são irregulares e com cáries, o palato pode ser alto e estreito. O queixo é pequeno e com leve retrognatia, tornando-se normal ou mesmo saliente nos adultos. As orelhas são grandes, com pavilhão

anteriorizado e posteriormente rodado. As mãos são largas e com falanges curtas. O pescoço é curto, às vezes alado, com implantação baixa do cabelo na nuca. Microcefalia leve pode estar presente. O tórax é largo com hipertelorismo mamário e pectus excavatum, pode ocorrer escoliose e/ou cifose, genitália anormal e cardiopatia. A hipotonia muscular é muito frequente (Turleau, 2008).

A baixa estatura proporcionada é encontrada na maioria dos pacientes, sendo a deficiência do crescimento, em geral, pós-natal. A baixa estatura pode ser agravada pela presença de alterações hipofisárias como, por exemplo, hipófise ectópica ou deficiência de hormônio do crescimento, ou por outras alterações hormonais, como o hipotireoidismo (Sebold et al., 2015).

Cerca de 10 a 15% dos pacientes apresentam malformações do sistema nervoso central (SNC) relacionadas ao espectro da holoprosencefalia (HPE) variando de sinais menores como incisivo central único até ciclopia (Turleau, 2008).

Várias anomalias esqueléticas são descritas, dentre elas: escoliose e/ou cifose, coxa vara, luxação de quadril e pé torto congênito (19 a 29%) (Sebold et al., 2015).

Malformações cardíacas de vários tipos são observadas em cerca de 10% a 56% dos pacientes (Portnoi et al., 2007; Turleau 2008; Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015).

A tendência para desenvolver doenças autoimunes e deficiência de imunoglobulina A (IgA) é observada em pacientes com alterações do cromossomo 18 em geral, sejam elas deleções, trissomias ou anel do cromossomo 18 (Dacou-Voutetakis et al., 1999; Jain et al., 2011). Porém, poucos são os trabalhos que avaliam as imunodeficiências e doenças autoimunes de forma sistemática, sendo os relatos encontrados na literatura apenas de pacientes isolados ou de poucos casos (Schinzel, 2001; Wester et al., 2006; Recalcati et al., 2010; Jain et al., 2011).

Browning (2010) descreveu uma paciente com deleção do braço curto do cromossomo 18 que apresentava, além da deficiência de IgA, a incapacidade de produzir anticorpos à vacina anti-pneumocócica polissacarídea não conjugada (Pneumovax II), indicando uma deficiência concomitante específica a anticorpos anti-polissacarídeos (PS). A paciente relatada apresentava quadro de infecção respiratória alta e genito-urinária recorrentes, sendo necessário o uso profilático de antibióticos. O autor sugere que a deficiência específica a anticorpos anti-polissacarídeos também deve ser investigada em pacientes com deleção 18p, pois esses apresentam quadro infeccioso mais grave que os pacientes que têm apenas a deficiência de IgA.

Recalcati et al. (2010) descreveram duas meninas com doenças imunológicas e rearranjos complexos envolvendo o braço curto do cromossomo 18 que apresentaram deleção e duplicação de regiões adjacentes. Os autores discutem alguns genes localizados em 18p que estariam relacionados à imunidade, entre eles o gene *LPIN2* (localizado em 18p11.31) e o gene *MC5R* (localizado em 18p11.21). Entretanto, as associações entre a deleção terminal de 18p e imunidade ainda não foram definidas.

Dolek-Cetinkaya et al. (2013) relataram um paciente com deleção 18p associada à síndrome poliglandular autoimune apresentando tireoidite autoimune, hipotireoidismo primário, diabetes mellitus tipo 1, hipogonadismo hipogonadotrófico, osteoporose e deficiência de hormônio de crescimento.

A deficiência intelectual está presente na maioria dos pacientes com deleção 18p, variando de leve a grave. Há relatos de pacientes com inteligência normal e limítrofe, mas poucos trabalhos com a investigação comportamental da personalidade desses pacientes (Babovic-Vuksanovic et al., 2004; Vermuelen et al., 2005).

A região entre 18p11.1 e 18p11.21 parece ser crítica na determinação da deficiência intelectual, uma vez que alguns pacientes com deleções mais distais apresentam desenvolvimento intelectual normal ou deficiência intelectual leve (Wester et al., 2006).

Atraso na aquisição da linguagem e lentidão são achados frequentes, mas convulsões e alterações eletroencefalográficas são raras (Turleau, 2008).

Alterações psiquiátricas foram descritas em pacientes com deleção 18p dentre elas esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno de ansiedade e autismo. Alguns autores indicam que pode haver um *locus* para susceptibilidade para o transtorno bipolar na região pericentromérica de 18p (Berrettini et al., 1994).

Babovic-Vuksanovic et al. (2004) descreveram um paciente com sinais clínicos faciais menores da síndrome da deleção 18p, esquizofrenia paranoide e deficiência intelectual leve, que foi diagnosticado só aos 42 anos de idade por FISH para região subtelomérica e que apresentava o cariótipo por bandamento de alta resolução normal.

Sebold et al. (2015) aplicaram o inventário GARS (do inglês, *Gilliam Autism Rating Scale*) em 21 pacientes de uma amostra de 31 indivíduos com deleção 18p11.1 e observaram que quatro indivíduos (19%) apresentaram-se claramente dentro do espectro autista e outros quatro (19%) possivelmente enquadravam-se dentro do espectro.

Os transtornos do espectro autista são etiologicamente heterogêneos e uma doença genética é encontrada em torno de 10-25% dos casos, incluindo doenças monogênicas,

alterações cromossômicas e desequilíbrios genômicos. Recentemente, muitas das raras variantes genômicas identificadas no espectro autista foram relacionadas com as vias de adesão da célula sináptica, contribuindo para a identificação dos genes relacionados às doenças do espectro autista (Betancur et al 2009; MacDonald et al., 2014). Dentre esses genes, o gene *DLGAP1* (localizado em 18p11.31, coordenadas: 3,496,029-4,455,309) pode estar relacionado às doenças do espectro autista, pois o seu produto gênico (GKAP1, *Homo sapiens G kinase anchoring protein 1, transcript variant 1, mRNA*) faz parte da densidade pós-sináptica de células neuronais.

Tabet et al (2015) relataram 18 pacientes com translocações aparentemente equilibradas com diagnóstico de autismo e encontraram deleções cromossômicas crípticas que variaram de 3,31 a 4,93 Mb. Um desses pacientes, com translocação t(5;18) herdada de sua mãe, apresentou uma deleção intersticial de 4,22 Mb em 18p11.22p11.31 (coordenadas: 5,408,997-9,625,750). Nessa região encontram-se 24 genes, dentre eles o *NDUFV2* (*Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2*), envolvido com a deficiência do complexo 1 mitocondrial de herança autossômica recessiva e outros dois genes, *EPB41L3* (*Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3*) e *ANKRD12* (*Ankyrin repeat domain 12*), ambos altamente expressos no tecido cerebral.

A avaliação neuropsicológica e psiquiátrica foi descrita por Willoughby et al. (2014) em um paciente com deleção 18p com ponto de quebra em 18p11.32. O paciente apresentou função intelectual limítrofe nas múltiplas áreas de desenvolvimento avaliadas, sem discrepâncias significativas entre os domínios verbais e não verbais. Os achados emocionais e de comportamento mostraram agressividade leve, ansiedade, baixa tolerância à frustração e diminuição na função executiva. O paciente apresentou dificuldade de relacionamento com os colegas, mas não preencheu critérios para sintomas de comportamento autista. Acredita-se que a deficiência intelectual, de linguagem e integração visuomotora estavam relacionadas ao tamanho da deleção, sendo maior o comprometimento quanto mais próximo do centrômero estava o ponto de quebra, achado também relatado por Wester et al. (2006). Outro achado importante foi o transtorno de ansiedade presente neste paciente e também relatado por Zavala et al. (2010).

Sebold et al. (2015) estudaram uma amostra de 91 pacientes com deleção 18p e selecionaram 34 com o mesmo ponto de quebra na região centromérica. A avaliação citogenômica por *microarray* e as avaliações clínicas detalhadas foram realizadas nesses 34 pacientes, a avaliação neuropsicológica em 32 pacientes. Além disso, os autores realizaram a

revisão dos prontuários médicos em 31 pacientes, ressaltando a importância da descrição destes pacientes e reforçando a necessidade de realizar o mesmo trabalho sistematizado comparando pacientes com pontos de quebra mais distais no braço curto do cromossomo 18.

Tem sido identificadas algumas regiões cromossômicas como críticas para vários achados da deleção 18p, incluindo deficiência intelectual, fâscies arredondada, deficiência de crescimento pós-natal, convulsões, ptose e pescoço curto (Wester et al., 2006; Brenk et al., 2007), mas estes achados não foram reproduzidos (Sebold et al., 2015).

Hasi-Zogaj et al. (2015) estudaram 106 pacientes com deleção 18p e diferentes pontos de quebra, sendo 98 avaliados por *array*. Os autores realizaram a caracterização molecular e clínica dos pacientes e discutiram os genes sensíveis à dose desta região cromossômica. Outros trabalhos recentes têm detalhado os achados citogenômicos, a correlação genótipo fenótipo e aspectos clínicos de pacientes com deleção 18p e de outras alterações envolvendo o cromossomo 18 (Carter et al., 2015; Cody et al., 2015; Soileau et al., 2015).

As manifestações clínicas mais prevalentes da deleção 18p com ponto de quebra na região centromérica segundo Hasi-Zogaj et al. (2015) estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência das manifestações clínicas na deleção 18p completa. Achados clínicos associados à deleção 18p completa e frequência encontrada por Hasi-Zogaj et al. (2015)

Achado clínico	Frequência (%)
Hipotonia/anormalidades do tono muscular	84
Complicações neonatais	71
Anomalias do SNC (excluindo do espectro HPE)	66
Otite média recorrente	61
Anomalias cardíacas	56
Ptose	55
Erros de refração	52
Estrabismo	42
<i>Pectus excavatum</i>	29
Deficiência auditiva	23
Deficiência isolada do hormônio de crescimento	23
Escoliose/Cifose	19
<i>Pes planus</i>	19
Criptorquidia	14
Panhipopituitarismo ou hipopituitarismo	13
Convulsões	13
Deficiência de IgG, IgM ou IgA	13
Holoprosencefalia ou microforma de HPE	13
Doença autoimune	10
Agnesia sacral	6
Hipoplasia do nervo óptico	6
Catarata congênita	6
Meningomielocoele	3

Fonte: Modificado de Hasi-Zogaj et al., 2015

2.1.3 Caracterização citogenética

Cerca de 2/3 dos pacientes com deleção 18p são decorrentes de deleções puras *de novo* e 1/6 são decorrentes de translocações *de novo* entre 18p e o braço longo de um cromossomo acrocêntrico. Nos demais pacientes, as alterações cromossômicas são decorrentes de translocação herdada, inversão, translocação complexa ou transmissão direta (Schinzel, 2001; Turleau, 2008), isocromossomo em 18q e cromossomo 18 em anel (Turleau, 2008).

Schaub et al. (2002), em uma amostra de 25 pacientes com deleção 18p terminal *de novo*, verificaram por meio de cariotipagem, FISH e microssatélites que cerca da metade dos casos apresentavam pontos preferenciais de quebra em 18p11.1 (região centromérica).

Mais recentemente, em uma amostra de 98 indivíduos com deleção 18p estudados por *array*, Hasi-Zogaj et al. (2015) encontraram em 42% dos pacientes ponto de quebra na região centromérica e os remanescentes distribuídos ao longo do braço curto do cromossomo 18.

Schaub et al. (2002) não encontraram diferença quanto à origem parental das deleções, ao contrário do que ocorre em outras monossomias parciais terminais *de novo*, como nas deleções 5p (síndrome do *cri du chat*), 4p (síndrome de Wolf-Hirschhorn) e deleção 18q, em que a origem paterna da deleção é preferencialmente observada. De fato, a origem parental da deleção 18p *de novo* parece ser igualmente materna ou paterna (Schaub et al., 2002; Turleau, 2008). Por outro lado, a transmissão familiar da deleção 18p é rara, sendo a maioria de origem materna (Uchida et al., 1965; Velagaleti et al., 1996; Tonk and Krishna, 1997; Rigola et al., 2001; Tsukahara et al., 2001).

Wester et al. (2006) estudaram uma amostra de sete pacientes com deleção 18p por FISH e análise por microssatélites e observaram achados semelhantes aos de Schaub et al. (2002), tanto com relação ao ponto de quebra preferencial quanto à origem parental.

Não há descrição de grandes deleções intersticiais em 18p, mas há algumas microdeleções descritas (Myers et al., 2014; Tabet et al., 2015).

2.1.4 Caracterização gênica da região do braço curto do cromossomo 18

O braço curto do cromossomo 18 contém 266 genes e 29 desses genes são identificados com fenótipo reconhecido do OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*)(CRCh/hg38). Alguns autores têm demonstrado a correlação entre determinadas características fenóticas da síndrome e os segmentos de 18p deletados; por outro lado, a maioria dos autores reforça que há muito a ser feito para melhorar a correlação genótipo-

fenótipo dessa região (Wester et al., 2006; Portnoi et al., 2007; Turleau, 2008; Recalcati et al., 2010; Spreiz et al., 2013, Sebold et al., 2015).

A correlação genótipo-fenótipo foi beneficiada pelo advento das técnicas de *array*, pois permitiu o melhor delineamento dos desequilíbrios cromossômicos e a correlação com a clínica observada. Com a sua utilização, foi possível verificar que, na deleção 18p, o ponto de quebra ocorre preferencialmente na região centromérica, permitindo delinear de forma mais acurada o fenótipo mais frequente em indivíduos com pontos de quebras similares. Outra abordagem utilizada foi descrever a clínica de pacientes com diferentes pontos de quebra para, por exclusão, comparar e mapear determinada característica para cada região cromossômica (Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015).

Sebold et al. (2015) propuseram que a grande variabilidade das manifestações clínicas observadas nos pacientes com deleção 18p persistiam, mesmo quando uma amostra uniforme, do ponto de vista citogenômico, foi avaliada, sugerindo que muitos dos genes da região 18p, quando em hemizigose, causam fenótipos de baixa penetrância (Sebold et al., 2015).

Venter et al. (2001) relataram que a região terminal do braço curto do cromossomo 18 apresenta baixa densidade de genes ou pelo menos um baixo número de genes candidatos que afetam o desenvolvimento, manutenção e/ou função do sistema nervoso central.

Outros fatores também poderiam contribuir para as diferentes manifestações clínicas dos pacientes com deleção 18p, tais como fatores ambientais, genótipo de cada paciente, a origem parental do cromossomo alterado e um possível *imprinting* genômico dos genes localizados no cromossomo 18. A diferença de origem parental do cromossomo deletado e/ou duplicado alterando o fenótipo podem ter como explicação dois fatores. Primeiro, o sexo do genitor pode afetar a razão de formação da mutação, mas como relatado anteriormente, a origem parental da deleção 18p parece ser igual entre os sexos (Schaub et al., 2002; Hasi-Zogaj et al., 2015). Um segundo fator, o *imprinting* genômico pode estar envolvido, resultando na diferença de expressão entre os alelos de acordo com a origem parental do cromossomo alterado. Zamani et al. (2014) relataram pacientes com duplicação 18q e deleção 18p herdadas e concluíram que há falta de evidência de *imprinting* genômico no cromossomo 18, ainda assim o *imprinting* de certos genes dessa região pode estar restrito a determinados tecidos ou estágios do desenvolvimento. Os autores também sugerem que a discordância do fenótipo nos pacientes pode estar relacionada a fatores ambientais ou efeito epigenético que precisam de mais estudos.

Há apenas um trabalho sobre genes sujeitos a *imprinting* no cromossomo 18, referente ao gene *GNAL* que contem dois promotores alternativos (Golf e XLGolf), diferentemente metilados no tecido cerebral humano (Corradi et al., 2001), sendo necessário a realização de mais estudos para a comprovação dos achados descritos.

Cody et al. (2009a), através de estudos clínicos e moleculares de pacientes com alteração do número de cópias do cromossomo 18, realizaram o primeiro esboço dos genes que afetam o fenótipo dos pacientes com alterações no cromossomo 18. Nesse trabalho os dados foram obtidos através de dois tipos de “pista”. A primeira pista era fornecida pelos genes sensíveis à dose já conhecidos da região deletada ou duplicada. A segunda pista era fornecida pela informação dos genes da região para um fenótipo específico para o qual o gene causador ainda não tinha sido identificado. Desta forma, o médico poderia antever o prognóstico clínico dependendo do segmento cromossômico deletado ou duplicado encontrado no estudo genômico.

Cody et al. (2009a) classificaram desta forma os genes como haploinsuficiente quando: 1- o gene foi identificado como responsável por uma condição recessiva em hemizigose com múltiplas CNVs de banco de dados de variantes genômicas; 2- o gene causa doença por efeito dominante-negativo; 3- o gene causa fenótipo indistinguível do alelo selvagem no camundongo heterozigoto para o alelo nulo; 4- o gene está associado à doença conhecida causada por deleção de único gene. Por outro lado, regiões foram marcadas como haploinsuficientes, quando um fenótipo específico identificado em indivíduos com deleção 18q ou 18p ocorria em uma região crítica (Figura 1). Os genes também foram classificados como com provável haploinsuficiência se havia evidência de que os seus efeitos se manifestavam apenas na presença de um fator ambiental (por exemplo: uso de drogas) ou requeriam um segundo evento para produzir o fenótipo. Finalmente, os genes foram considerados haploletais se o alelo nulo homozigoto no camundongo era inviável. Porém, a maioria dos genes avaliados no cromossomo 18 foi classificada como de efeito desconhecido. Esse foi o trabalho inicial para definir quais genes no cromossomo 18 eram sensíveis à dose e para tentar explicar as características clínicas encontradas nos pacientes com alterações estruturais no cromossomo 18 (Cody et al., 2009a; 2009b).

O trabalho resultou na criação de um endereço eletrônico customizado no Genome Browser com o mapeamento de dosagem gênica e efeitos fenotípicos para os pacientes com alterações no cromossomo 18. Este banco de dados pode ser consultado e os pacientes adicionados ao estudo no *site* <http://pediatrics.uthscsa.edu/centers/chromosome18/dosage.asp>.

Na figura 1 observamos os fenótipos identificados e mapeados no braço curto do cromossomo 18 obtido no endereço eletrônico citado acima e relacionados à região 18p (Figura 1).

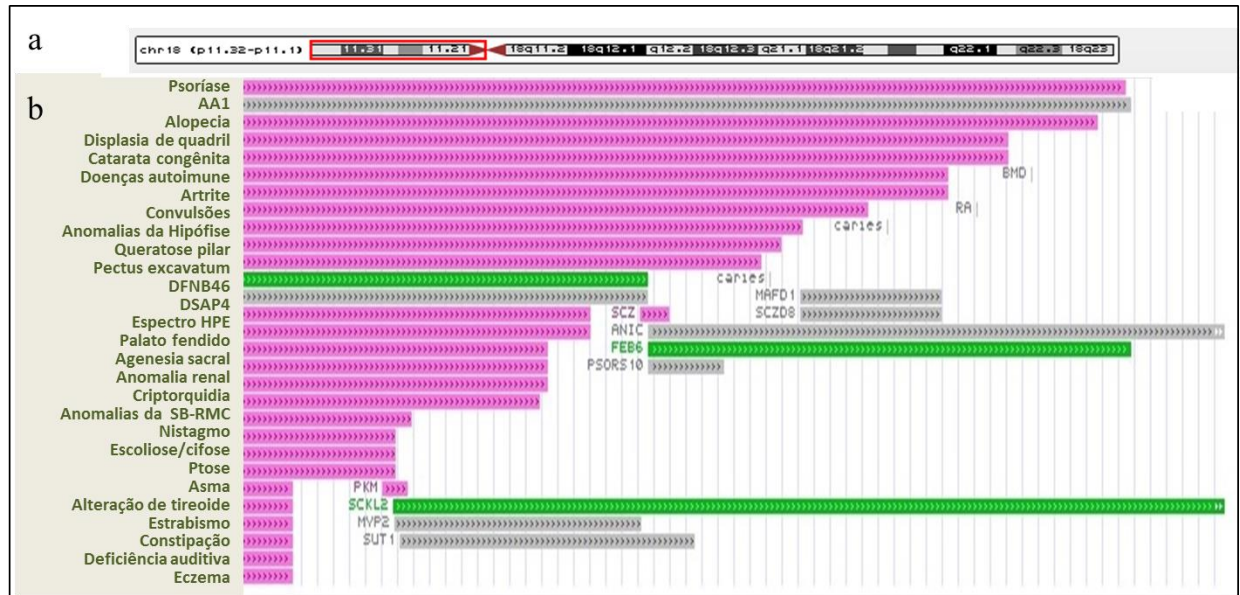


Figura 1: Fenótipos relacionados à região 18p. Idiograma do cromossomo 18 onde o retângulo vermelho evidencia o braço curto (a). As barras coloridas representam as alterações fenotípicas e algumas doenças com os genes ressaltados ao lado das mesmas (b). AA1: Alopecia areata-tipo 1; DFNB46: Surdez autossômica recessiva não síndrômica-46; DSAP: Poroqueratose actínica superficial disseminada. Modificado de <http://pediatrics.uthscsa.edu/centers/chromosome18/dosage.asp>.

Na figura 2, observamos os genes mapeados no braço curto do cromossomo 18 representados pelo código de cores em relação à sensibilidade à dose obtidos no endereço eletrônico citado acima (Figura 2).

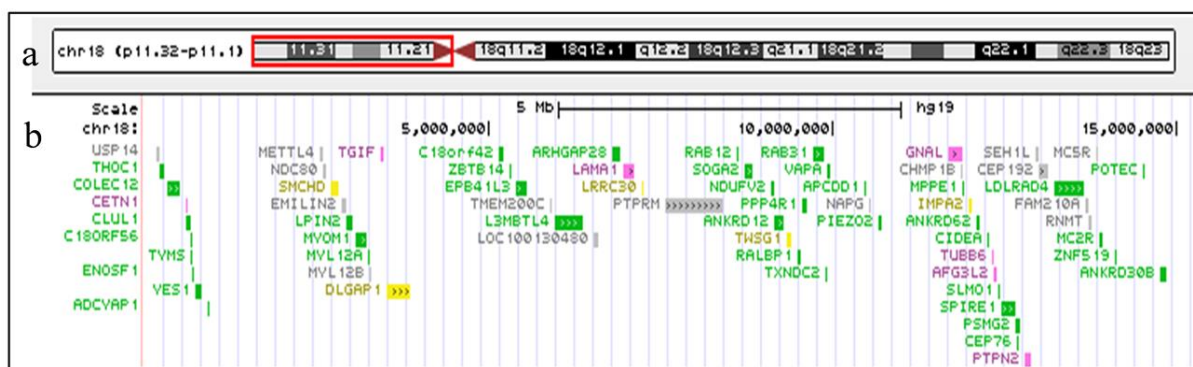


Figura 2: Genes localizados no braço curto do cromossomo 18 com código de cores em relação à sensibilidade à dose. Idiograma do cromossomo 18, retângulo vermelho evidenciando o braço curto (a). Abaixo alguns genes em diferentes cores que se encontram no braço curto do cromossomo 18 (b). Classificação em relação à sensibilidade à dose e seu efeito quando o número de cópias está alterado, sendo assim representados: 1- em verde não é provável que o gene cause um fenótipo quando o número de cópias é alterado (por exemplo, *THOC1* e *LPIN2*); 2 - em rosa o gene é sensível à dose, podendo ter alta ou baixa alta penetrância no fenótipo alterado (por exemplo, *TGIF1*, *LAMA1*, *GNAL* e *CETN1*); 3 - em amarelo a alteração do número de cópias do gene somente resulta em fenótipo na presença de um segundo evento, seja genético ou ambiental (por exemplo, *SMCHD*, *DLGAP1* e *TWSG1*); 4 - em vermelho o gene é haplolethal (não há na região); 5 - em cinza o efeito da alteração do número de cópias é desconhecido (por exemplo, *MCSR*, *CEP192* e *RNMT*).

Modificado de “Chromosome 18 gene annotation/gene dosage map”:

<http://pediatrics.uthscsa.edu/centers/chromosome18/dosage.asp>

Recentemente, vários trabalhos com amostras maiores de pacientes estudados por *array* foram publicados, mostrando o grande interesse em definir o fenótipo característico da deleção 18p e dos genes da região que influenciam o fenótipo. Sebold et al. (2015) consideram que dentre os 67 genes no braço curto do cromossomo 18 relacionados com doenças do OMIM, a grande maioria não contribui para o fenótipo quando em hemizigose e identificaram 12 genes que sugerem ser dose sensível. Alguns desses genes (Figura 3) podem requerer um segundo fator, genético ou ambiental, além da hemizigose, para manifestar o fenótipo (Sebold et al., 2015).

Na tabela 2, as coordenadas relacionadas a fenótipos descritos por Hasi-Zogaj et al. (2015) na região do braço curto do cromossomo 18 são mostradas.

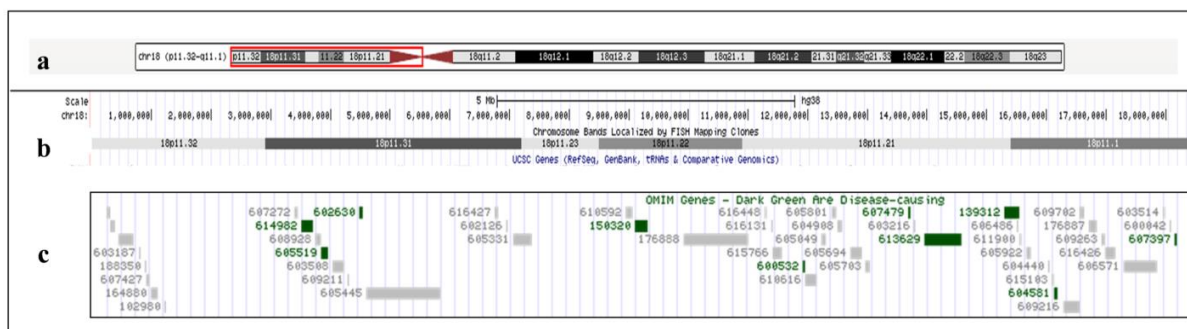


Figura 3: Representação gráfica do braço curto do cromossomo 18 e os genes mais importantes da região. Idiograma do cromossomo 18, segmento em vermelho evidenciando o braço curto (a). Bandas do braço curto em escala (b). OMIM dos genes mais importantes da região; em verde escuro os genes que causam doenças conhecidas e em cinza claro os genes que não estão associados a fenótipos conhecidos, mas estão localizados na região (c). Modificado de <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>.

Tabela 2: Coordenadas referentes às regiões críticas para o fenótipo deleção 18p (hg19)

Fenótipo	Coordenadas da região crítica do ponto de quebra
Anomalias da substância branca	5,384,745-5,389,025
Ptose	2,928,722-2,931,532
Estrabismo	1,186,153-1,192,031
<i>Pectus excavatum</i>	9,137,595-9,148,020
Escoliose/cifose	2,928,722-2,931,532
Deficiência auditiva	2,928,722-2,931,532
Doenças Autoimunes	12,316,423-12,317,830
Criptorquidia	5,513,853-5,520,172
Anomalias estruturais da hipófise	9,845,654-9,849,184
Convulsões	10,940,462-10,952,107
Deficiência auditiva neurosensorial	1,186,153-1,192,031
Agenesia sacral	5,513,853-5,520,172
Tetralogia de Fallot	9,137,595-9,148,020
Catarata congênita	13,323,513-13,325,333
Displasia de quadril	13,323,513-13,325,333

Fonte: Modificado de Tabela 1 suplementar de Hasi-Zogaj et al., 2015

Vários trabalhos subsequentes mostraram a importância da metodologia empregada pelos autores, que inicialmente se concentraram no mapeamento do braço longo e, posteriormente, no mapeamento do braço curto do cromossomo 18 (Cody et al., 2009b, 2014; Heard et al., 2009; Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015).

2.2 Síndrome do Cromossomo 18 em Anel

Os cromossomos em anel (r) foram descritos pela primeira vez em humanos em 1962 (Genest et al., 1962; Lindsten e Tillinger, 1962; Wang et al., 1962), sendo que dois, dos três pacientes, apresentavam anel do cromossomo 18 (Wang et al., 1962). Em 1964, Gropp et al. (1964) a descreveram as malformações associadas como características sindrômicas.

2.2.1 Epidemiologia

Os cromossomos em anel são raros e a frequência em geral está em torno de 1/30.000 a 1/60.000 nascidos vivos.

Até a presente data, aproximadamente 130 pacientes com r(18) foram descritos, sendo a maioria composta por casos isolados. A baixa incidência pode estar relacionada tanto com o mecanismo complexo de formação dos anéis, quanto com o alto grau de perda embrionária e fetal das gestações com esta alteração cromossômica (Spreiz et al., 2013; Carter et al., 2015).

2.2.2 Caracterização citogenética

Os cromossomos em anel foram descritos para todos os cromossomos humanos, sendo 50% dos casos em cromossomos acrocêntricos. Apenas 1% dos casos são herdados (Caba et al., 2012). Na maioria dos casos, o cromossomo em anel é formado durante a meiose ou nas primeiras divisões pós-zigóticas (Yardin et al., 2001).

Outra característica única dos cromossomos em anel em comparação com outros tipos de derivados é a sua instabilidade após sucessivas mitoses. Sodré et al. (2011) investigaram 14 pacientes com diferentes anéis cromossômicos e observaram a perda do anel e alterações cromossômicas secundárias em 11 pacientes, após sucessivas mitoses, sendo que apenas três pacientes apresentaram cromossomos em anel estáveis.

Além disso, observa-se que nos anéis cromossômicos podem ocorrer duplicações nas regiões justa-proximal do ponto de quebra, fenômeno descrito pela primeira vez por Ballif et al. (2003) em anel do cromossomo 1.

Em estudo usando-se CGH array (do inglês, *Comparative Genomic Hybridization array*) e FISH em 33 pacientes com cromossomos em anel, Rossi et al. (2008) detectaram em sete casos rearranjos inversão-duplicação-deleção (inv-dup-del) nos pontos de quebra e união dos cromossomos em anel, o que poderia ser responsável por algumas peculiaridades da grande variação entre pacientes com anel, mais do que o mosaicismo ou instabilidade do cromossomo em anel.

2.2.3 Características clínicas

Uma vez que a formação dos anéis cromossômicos envolve quebras nos braços curtos e longos do cromossomo e reunião das porções restantes com perdas das regiões distais aos pontos de quebra, o quadro clínico dos pacientes em geral está relacionado ao fenótipo resultante da combinação da perda de ambos os braços cromossômicos.

A maioria dos pacientes com r(18) compartilha sinais e sintomas dos pacientes com a deleção 18q, sendo que a minoria deles é mais semelhante, do ponto de vista fenotípico, aos pacientes com deleção 18p ou com a combinação das duas síndromes (Schinzel, 1974; Aritaki et al., 1996; Nakayama et al., 1997).

O fenótipo variável apresentado pelos pacientes com anel cromossômico depende dos diferentes tanto dos genes sensíveis à dose, que estão em hemizigose em cada braço cromossômico envolvido, quanto da modificação da arquitetura cromossômica, bem como do grau de mosaicismo e instabilidade do anel cromossômico (Guilherme et al., 2011-Apêndice 2; Caba et al., 2012).

Em uma das primeiras descrições, de Grouchy (1965) comparando dois pacientes com r(18), um com deleção 18p e o outro com deleção 18q, sugeriu que o gene da atresia aural estivesse em 18q, fato este confirmado 49 anos depois por Feenstra et al. (2011), que identificaram o gene *TSHZ1* em 18q23, atualmente relacionado com esta característica.

O fenótipo dos pacientes com r(18) é caracterizado principalmente por baixa estatura, microcefalia, deficiência intelectual de moderada a grave, micropênis, criptorquia, hipertelorismo, pregas epicânticas, micrognatia e mãos pequenas. Alterações neurológicas como atraso de aquisição de linguagem, hiperatividade, movimentos estereotipados, convulsões e mielinização anormal também foram descritas nesses pacientes (Koç et al., 2008).

Aproximadamente 75% dos pacientes com r(18) são do sexo feminino e poucos pacientes com r(18) com transmissão familiar foram descritos (Christensen et al., 1970; Balci et al., 2014).

Jain et al. (2011) relataram um paciente com r(18) que apresentava baixa estatura, dismorfias, deficiência intelectual leve e poliendrocrinopatia autoimune, com hipertireoidismo, diabetes mellitus tipo 1, vitiligo e deficiência de IgA. Os autores sugeriram que certos genes ou grupo de genes do cromossomo 18 podem ter funções específicas na regulação imune.

Spreiz et al. (2013) realizaram a caracterização clínica e molecular por SNP *array* (do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism array*) de nove pacientes com r(18) e relataram que um fenótipo típico não foi caracterizado, sendo as manifestações clínicas observadas dependentes dos segmentos do cromossomo 18 envolvidos. Além das deleções terminais em 18p e 18q, os autores encontraram regiões duplicadas em dois pacientes da amostra reforçando a importância do estudo citogenômico. Os autores também sugeriram que a interação e a modificação da expressão dos genes afetados são igualmente ou até mais importantes para a determinação do fenótipo do que apenas as deleções encontradas.

Esses achados foram confirmados por Carter et al. (2015) que relataram 30 pacientes com r(18) e encontraram vários pacientes com pequenas duplicações próximas aos pontos de quebra.

Estes trabalhos concluíram que cada indivíduo com r(18) apresenta uma constituição cromossômica única e que essa diversidade citogenômica observada torna muito difícil a correlação genótipo-fenótipo nesses pacientes.

Soileau et al. (2015) avaliaram adultos com anormalidades do cromossomo 18 utilizando os mesmos pacientes com r(18) da amostra de Carter et al. (2015), além de pacientes com tetrassomia 18p, deleções 18p e 18q. Nesse trabalho, os pacientes foram avaliados do ponto de vista neuropsicológico, comportamental e de expectativa de vida, sendo que os autores confirmaram a dificuldade em se definir a correlação genótipo-fenótipo nos pacientes.

Soileau et al. (2015) observaram que a expectativa de vida dos pacientes com r(18) da amostra foi significativamente menor que a encontrada nos indivíduos com tetrassomia 18p, deleções 18p ou 18q, sugerindo que os pacientes com r(18) apresentam quadro clínico e comorbidades mais graves comprometendo a sua longevidade (Carter et al., 2015; Soileau et al., 2015).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina pelo Processo: CEP 1403/09 (Anexo 1).

Todos os pacientes ou responsáveis, após terem sido convidados a participar do estudo, assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido, concordando com a realização do trabalho (Anexo 2).

3.1 Casuística

Foram recrutados pacientes com deleção 18p do Centro de Genética Médica da UNIFESP-EPM, ou que foram encaminhados a ele, já com o diagnóstico ou suspeita da síndrome da deleção 18p a partir do estudo citogenético por bandamento G.

Foram investigados 12 pacientes, 11 avaliados no Centro de Genética Médica da UNIFESP e um no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP. Entre eles, cinco pacientes apresentaram deleção 18p “pura”, dois com anel r(18) com deleção 18p associada à deleção 18q e cinco apresentaram deleção 18p associada à duplicação ou deleção parcial de outro cromossomo autossômico (cromossomos 5, 9, 16 e 21).

3.2 Metodologia

3.2.1 Avaliação Clínica

A avaliação clínica foi realizada a partir de um protocolo clínico específico (Anexo 3), definido como descrito no item 3.2.1.1.

3.2.1.1 Definição do protocolo de investigação

A partir de revisão da literatura foi criado um protocolo clínico de investigação para o estudo genético clínico sendo considerado os sinais fenotípicos encontrados nos pacientes com deleção 18p.

Uma planilha de dados foi criada no programa Microsoft Excel incluindo os achados clínicos, exames complementares, citogenéticos e avaliações neuropsicológica e imunológica, de forma a facilitar a realização da correlação genótipo-fenótipo e destacar os sinais mais prevalentes na síndrome. A partir dessa planilha, várias tabelas com os dados dos pacientes foram geradas para se estabelecer os achados mais frequentes nos pacientes.

O protocolo clínico incluiu:

1-Anamnese com o próprio paciente e/ou seus familiares abordando: identificação, etnia, presença de consanguinidade, antecedentes familiares, antecedentes gestacionais e construção do heredograma.

2-Exame físico geral e dismorfológico com descrição do fenótipo externo e medidas antropométricas, segundo Hall et al. (1989), lista de verificação dos sinais mais prevalentes na deleção 18p e fotografias clínicas. Para recém-nascidos pré-termo foram utilizadas as medidas antropométricas segundo Olsen et al. (2010). Para o perímetro cefálico em adultos foram utilizadas as tabelas de Bushby et al. (1992).

3-Exames laboratoriais e de imagem foram solicitados de acordo com o protocolo clínico de investigação.

3.2.1.2 Avaliação Clínica da Amostra

Os pacientes foram avaliados do ponto de vista clínico unicamente pela pesquisadora principal do projeto através do protocolo específico, no Centro de Genética Médica da UNIFESP-EPM, no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP e no Ambulatório de Imunopediatria da Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo.

Após a investigação citogenômica, os pacientes foram reavaliados sob o ponto de vista clínico considerando-se os rearranjos cromossômicos encontrados, segundo listas de sinais presentes nas síndromes, de acordo com dados da literatura.

Dependendo do caso, exames complementares pertinentes foram solicitados, como exames de imagem e laboratoriais.

3.2.1.3 Avaliação Neuropsicológica

Em função da ampla variação das idades e dos prejuízos cognitivos dos pacientes da amostra, o uso de um protocolo unificado de avaliação neuropsicológica envolvendo testes específicos, como os associados a baterias fixas como o NEPSY-II (do inglês, *Developmental NEuroPSYchological Assessment*), tornou-se inviável. Optou-se assim por procedimentos de avaliação do desempenho intelectual (ou desenvolvimento neuropsicomotor, em crianças com menos de cinco anos), das habilidades adaptativas e de aspectos comportamentais (Strauss et al, 2006).

O desempenho intelectual global foi investigado por meio das escalas Wechsler para crianças de 6 a 16 anos (WISC III) e para adultos (WAIS III). Além dos índices de quociente

de inteligência (QI), constituídos por Quociente de inteligência verbal (QIV), de execução (QIE) e total (QIT), foram considerados os resultados obtidos em cada subteste (Weschler, 2002; 2004).

Na avaliação do comportamento adaptativo utilizou-se a escala Vineland II - *Vineland Adaptive Behavior Scales* (Sparrow et al., 1984), respondida pelos familiares. A avaliação neuropsicológica foi complementada por uma investigação comportamental, com base em um inventário de comportamentos da infância e adolescência – *Child Behavior Checklist -CBCL* (Achenbach, 1991).

O desempenho intelectual é avaliado conforme escala de escore padrão (standard score), em que a média é 100. A classificação varia conforme a pontuação: deficiência intelectual - abaixo de 70; limítrofe - de 70 a 79; médio inferior- de 80 a 89; médio - de 90 a 109; médio superior - de 110 a 119; superior - acima de 120. O diagnóstico de deficiência intelectual (DI), seguindo critérios atuais do DSM 5 (APA, 2013), se baseia na presença de QI abaixo de 70 associado a dificuldades adaptativas (pelo menos em duas áreas) nos domínios conceitual, social e prático. Importante destacar que a classificação conforme nível de gravidade passou a considerar o funcionamento adaptativo e não faixas de QI.

As avaliações foram realizadas por neuropsicólogos experientes e em salas apropriadas no Núcleo de Atendimento Neuropsicológico Infantil Interdisciplinar, uma das unidades do Centro Paulista de Neuropsicologia-AFIP.

3.2.1.4 Avaliação da Imunidade Humoral

A avaliação imunológica foi realizada a partir da avaliação clínica e determinação das imunoglobulinas séricas IgG, IgM e IgA, produção de anticorpos a antígenos proteicos e polissacarídeos e avaliação do sistema complemento, em colaboração com o setor de Imunologia Clínica da UNIFESP-EPM.

De acordo com os resultados obtidos, novas avaliações foram solicitadas para melhor detalhar a imunodeficiência encontrada.

A deficiência de resposta a antígenos polissacarídeos (PS) foi determinada pela medida da resposta a vacina polissacarídea para o pneumococo. Os sorotipos IgG anti-pneumococco testados por ELISA para este trabalho foram 1, 3, 4, 6B, 14, 18C, 19F e 23F, seguindo o protocolo de Sorensen et al. (1998).

3.2.1.5 Avaliação Radiológica

A avaliação radiológica constituiu-se de estudo radiológico do esqueleto, ressonância magnética de crânio e de hipófise.

3.2.4 Avaliação Citogenômica

3.2.4.1 Coleta do material e obtenção de DNA

Amostras de sangue periférico dos pacientes, e quando possível de ambos os pais, foram coletadas para a realização do cariótipo e FISH, a partir de culturas de linfócitos, e análise de *array* genômico, a partir da extração de DNA.

Foram coletados, de cada indivíduo, 5 mL de sangue periférico por punção venosa, em tubo a vácuo contendo heparina, para o estudo citogenético, e 5 mL em tubo a vácuo contendo o anti-coagulante EDTA, para extração de DNA.

O DNA foi extraído a partir de linfócitos de sangue periférico utilizando o *kit* para a extração de DNA de sangue periférico Gentra Puregene (Qiagen-Sciences, Maryland, USA).

A concentração de DNA genômico obtida foi medida com espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Technologies).

3.2.4.2 Citogenética Clássica

O cariótipo dos pacientes e de seus pais foi realizado por meio do protocolo padrão de bandamento G. A análise foi feita em microscópio óptico (Zeiss) em aumento de 1000×, sendo 20 metáfases capturadas no Sistema de Imagem de Cariótipo IKAROS (Metasystem). Os cromossomos metafásicos com resolução de 550 bandas cromossômicas foram classificados conforme descrito pelo sistema internacional de nomenclatura para citogenética humana (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*”- ISCN, 2013).

3.2.4.3 Estudo molecular por meio de *array*

Os estudos moleculares foram realizados com *arrays* genômicos (*Genome-Wide Human SNP array* 6.0 - Affymetrix®, Santa Clara, CA) de acordo com instruções do fabricante. Esses *arrays* apresentam oligonucleotídeos de 25 pares de bases (pb) ligados a uma superfície de quartzo. As lâminas possuem cerca de 906.600 sondas de oligonucleotídeos de SNPs (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) e 946.000 sondas para a detecção de CNVs (do inglês, *copy number variation*) separadas por uma distância média de 680 pb. Os procedimentos foram realizados na *Core Facility* do laboratório da Associação Fundo de

Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), de acordo com os protocolos do fabricante (http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/cyto_assay_usermanual.pdf). Os resultados foram analisados pelo software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS, Affymetrix), de acordo com o GRCh37/hg19.

3.2.4.4 FISH-BAC para validação dos resultados de array

Para a validação dos pontos de quebra encontrados pela técnica de *array*, os experimentos com FISH foram realizados utilizando-se sondas clonadas em BACs (do inglês, *bacterial artificial chromosomes*) produzidas pela *University of California* (Santa Cruz, CA, EUA), de acordo com protocolo modificado por Carvalho et al. (2008). As sondas foram selecionadas com o auxílio das bases de dados: *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) e eFISH (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/efish/index.cgi>). No caso de translocações, foram escolhidas sondas com sequências abrangendo a região do ponto de quebra, de forma que o sinal de marcação pudesse ser observado em ambos os cromossomos derivados da translocação.

3.2.5 Correlação genótipo/fenótipo

A correlação genótipo fenótipo foi realizada com o auxílio de várias bases de dados, como por exemplo: *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>); *ClinGen* - Clinical Genome Resource (<http://clinicalgenome.org/>) e DECIPHER - Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (<https://decipher.sanger.ac.uk/>), além do estudo e revisão de casos descritos na literatura (Rosenbloom et al., 2015).

3.2.6 Análise dos dados

3.2.6.1 Tabulação de dados

Uma planilha de dados informatizada foi criada no Microsoft Excel, com base no protocolo clínico e nos dados encontrados na revisão da literatura, com o objetivo de facilitar a definição das similaridades e discrepâncias entre os pacientes do trabalho e os da literatura.

3.2.6.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados de acordo com sua frequência relativa e absoluta e em relação aos pontos de quebra observados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

Foram estudados, sob o ponto de vista clínico, 12 pacientes diagnosticados previamente com deleção do braço curto do cromossomo 18 ou anel do cromossomo 18, sendo sete do sexo masculino e cinco do sexo feminino.

Todos os genitores foram avaliados com exceção dos genitores da paciente 6 que foi adotada e não obtivemos acesso ao material dos genitores biológicos, e da paciente 3 cujo genitor já era falecido no momento do estudo.

Dentre os genitores avaliados, quatro apresentaram translocações equilibradas que envolviam o braço curto do cromossomo 18 e outro cromossomo autossômico (5q, 8p, 9p e 16q).

Para permitir uma melhor correlação genótipo/fenótipo, os pacientes foram classificados em três grupos de estudo, em função da presença de outros cromossomos duplicados ou deletados, além da deleção do braço curto do cromossomo 18.

Desta forma, classificamos e separamos os pacientes nos seguintes grupos:

Grupo I: Pacientes com deleção “pura”, composto por pacientes que apresentaram apenas a deleção do braço curto do cromossomo 18.

Grupo II: Pacientes com anel do cromossomo 18, composto pelos pacientes que apresentavam deleção do braço curto e do braço longo do cromossomo 18.

Grupo III: Pacientes com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo.

4.2 Estudo clínico

O protocolo clínico, com a lista de verificação de sinais para a síndrome da deleção 18p (Anexo 3), foi elaborado a partir da revisão da literatura. Nos pacientes que apresentaram outros desequilíbrios cromossômicos associados à deleção 18p, foi necessário realizar nova revisão da literatura para o desequilíbrio específico associado e melhor caracterização genótipo-fenótipo do paciente.

4.2.1 Descrição clínica dos pacientes com deleção pura (Grupo I)

4.2.1.1 Paciente 1: A.C.P.I.

Paciente do sexo feminino (Figura 4), primeira filha de casal jovem não consanguíneo. O genitor apresentava 19 anos e a genitora 18 anos de idade na época do nascimento da paciente. Posteriormente a genitora apresentou mais duas gestações, uma delas sendo um abortamento no terceiro mês de gestação e a outra uma criança normal do sexo masculino.

O período pré-natal transcorreu sem intercorrências. A paciente nasceu de parto normal, pré-termo de 34 semanas de idade gestacional, adequada para a idade gestacional. O peso ao nascer (PN) foi de 2.160 g (percentil 50); o comprimento ao nascer (CN) foi de 44 cm (entre os percentis 25 e 50); e o perímetro cefálico (PC) foi de 30 cm (percentil 25); percentis avaliados para 34 semanas de gestação.

Durante o período neonatal, a paciente apresentou desconforto respiratório e icterícia fisiológica, necessitando de intubação oro-traqueal com oxigenoterapia e fototerapia. A suspeita de alteração cromossômica foi levantada durante a internação neonatal, pois a recém-nascida apresentava desvios fenotípicos menores e hipotonia.

O cariótipo por bandamento G revelou a deleção 18p e a paciente recebeu alta do berçário com 50 dias de vida.

A primeira avaliação genético-clínica foi realizada aos seis meses de vida, quando apresentava: Comprimento (C) de 61,5 cm (percentil 3); Peso (P) de 6.300 g (entre os percentis 3 e 15); PC de 41 cm (percentil 15).

O exame dismorfológico revelou: dolicocefalia, fâscies arredondada, hipertelorismo ocular, hemangioma plano na fronte, pinçamento frontal, fenda palpebral oblíqua com inclinação superior, epicanto bilateral, orelhas rodadas posteriormente, ponte nasal deprimida, narinas antevertidas, comissura labial com cantos voltados para baixo, palato alto, pescoço curto, ânus anteriorizado e extensa mancha mongólica em dorso além de hipotonia axial e discreta hipertonia apendicular.

Aos três anos e seis meses de idade, a paciente apresentava desenvolvimento neuropsicomotor adequado para a faixa etária. Ao exame físico, além das mesmas dismorfias encontradas anteriormente, apresentava: Estatura (E) de 97 cm (entre os percentis 15 e 50); P de 16 kg (entre os percentis 50 e 85) e PC de 48,5 cm (entre os percentis 15 e 50).

A paciente apresentou seis episódios de broncopneumonia, desde o nascimento até os quatro anos de idade, necessitando de internação hospitalar por duas vezes.

O ecocardiograma realizado aos dois meses de vida mostrou forame oval pérvio. As avaliações endocrinológica e imunológica foram normais até a data da última consulta.



Figura 4: Fotos da paciente 1. Vista frontal do rosto aos quatro meses (a, b), aos seis meses (c) e aos três anos de idade (d).

4.2.1.2 Paciente 2: D.A.B.

Paciente do sexo feminino (Figura 5), quarta filha de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 35 anos e a genitora 32 anos de idade, na época do nascimento da paciente, sendo que a genitora apresentou cinco gestações e um abortamento, até a última reavaliação realizada.

O pré-natal transcorreu sem intercorrências. A paciente nasceu de parto normal, a termo, adequada para a idade gestacional (AIG); com PN de 3.000 g (entre os percentis 25 e 50); CN de 48 cm (entre os percentis 25 e 50); PC não referido. Apresentou uma circular de cordão e o APGAR de primeiro minuto foi 8 e de 10 minutos foi de 9. Recebeu alta do berçário aos dois dias de vida.

A primeira avaliação pelo geneticista clínico foi aos três anos e nove meses de vida quando apresentava: E de 91 cm (abaixo do percentil 3); P de 12 kg (percentil 3) e PC de 49 cm (percentil 50).

O exame dismorfológico revelou: braquicefalia, hipertelorismo ocular, fenda palpebral oblíqua com inclinação inferior, epicanto bilateral, ptose palpebral, sobrancelhas ralas, fosseta pré-auricular à direita, orelhas rodadas posteriormente e de implantação baixa bilateralmente, narinas antevertidas, palato alto, pescoço curto, *pectus carinatum* e hiper mobilidade articular. Apresentava também hipotonia muscular global e atraso importante do desenvolvimento neuropsicomotor.

O ecocardiograma aos três anos e três meses de idade revelou forame oval pérvio, sem repercussão hemodinâmica, que evoluiu com fechamento espontâneo.

A ressonância magnética de crânio (RMC) revelou dilatação ventricular compensatória e múltiplos focos de alteração de sinal da substância branca supratentorial, sinais que evidenciam anoxia neonatal.

A ressonância magnética de hipófise (RMH) foi normal.

As avaliações endocrinológica e imunológica foram normais.

Aos seis anos e dez meses de idade apresentava E de 112 cm (entre os percentís 3 e 15); P de 23 kg (entre os percentís 50 e 85); índice de massa corporal (IMC) de 18,4 (entre os percentís 85 e 97); PC de 51,5 cm (percentil 50) e os mesmos desvios fenotípicos descritos anteriormente acrescidos de presença de *ulerythema ophryogenes* no rosto em volta do nariz e filtro.

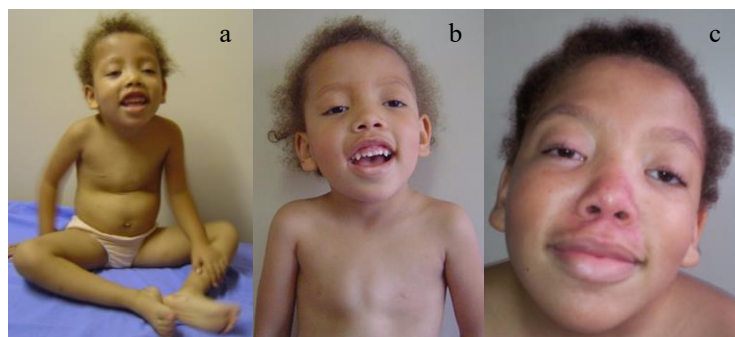


Figura 5: Fotos da paciente 2. Vista frontal do corpo inteiro e fásces aos 27 meses (a,b) e vista frontal do rosto aos nove anos de idade (c).

4.2.1.3 Paciente 3: M.L.S.

Paciente do sexo feminino (Figura 6), quarta filha de casal não consanguíneo, genitor falecido. O genitor apresentava 39 anos e a genitora 27 anos de idade na época do nascimento da paciente, sendo a genitora IV Gesta; V Para e sem abortamento.

A gestação foi gemelar e o pré-natal transcorreu sem intercorrências. A paciente é a primeira gemelar, nascida de parto cesáreo, pré-termo (referido pela mãe como 32 semanas), com PN de 1.720 g (entre os percentis 25 e 50) e CN e PC não registrados. A segunda gemelar nasceu com PN de 1.520 g (percentil 25), CN e PC não registrados e apresentou anoxia neonatal grave. As gêmeas permaneceram no berçário para ganho de peso e receberam alta aos vinte e nove dias de vida.

A paciente 3 foi encaminhada pelo pediatra para avaliação genético clínica aos 11 anos e sete meses de vida por baixa estatura, dismorfias e deficiência intelectual. Apresentava nesta idade E de 113 cm (abaixo do percentil 3), P de 26 kg; IMC de 20,47 (entre os percentis 50 a 85) e PC de 49 cm (abaixo do percentil 3).

O exame físico dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, microcefalia, hipertelorismo ocular, fenda palpebral oblíqua inferior bilateralmente, epicanto bilateral, ptose palpebral bilateral mais acentuada à direita, sobrancelhas ralas, orelhas rodadas posteriormente e de implantação baixa, narinas antevertidas, palato alto, gengivas hipertrofiadas, dentes de implantação anômala, pescoço curto, tórax alargado, hipertelorismo mamário, metacarpos curtos, persistência das almofadas digitais fetais, hiperlordose lombar, pés planos, pele seca e infiltrada e hiperqueratose papilar em membros e tronco. A paciente apresentava também hipotonia muscular global e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

O ecocardiograma foi normal.

A ressonância magnética de crânio revelou focos de gliose na substância branca na região de transição corticomediana e a ressonância magnética de hipófise foi normal.

O quadro clínico sugeria, além de alteração cromossômica, hipotireoidismo e a paciente foi encaminhada para avaliação endocrinológica que confirmou a suspeita clínica de hipotireoidismo de forma que manteve, até a última reavaliação realizada, tratamento com levotiroxina sódica.

A segunda gemelar apresentava, na mesma data, E de 150 cm (percentil 50), P de 49 kg; IMC de 21,7 (entre os percentis 50-85) e PC de 52 cm (percentil 10), sem desvios fenotípicos, mas apresentando deficiência intelectual. O cariótipo por bandamento G foi normal para o sexo feminino e a RMC revelou sinais de anoxia neonatal grave.

Aos 18 anos, a paciente 3 apresentava: E de 134,5 cm (abaixo do percentil 3), P de 37,6 kg; IMC de 21 (entre os percentis 50-85) e PC de 50 cm (abaixo do percentil 3); sendo observados os mesmos desvios fenotípicos descritos anteriormente, acrescido de hiperqueratose extensa em membros, tronco e abdômen.

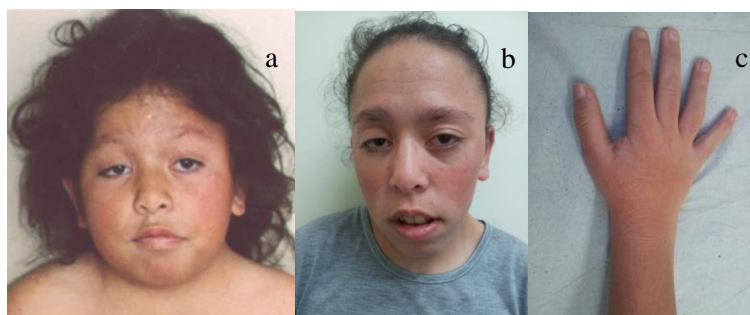


Figura 6: Fotos da paciente 3. Vista frontal do rosto nas idades de 8 anos (a) e 18 anos (b). Detalhe da mão direita da paciente mostrando a pele com hiperqueratose (c).

4.2.1.4 Paciente 4: L.B.L.

Paciente do sexo masculino (Figura 7), quarto filho de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 32 anos e a genitora 27 anos de idade na época do nascimento do paciente, sendo que a genitora apresentou cinco gestações e nenhum abortamento.

A gestação ocorreu com pré-natal e a genitora informou que os movimentos fetais foram reduzidos e fracos.

O paciente nasceu de parto normal, a termo com PN de 3.140 g (percentil 50), CN de 50 cm (percentil 50) e PC não registrado. O paciente recebeu alta do berçário aos dois dias de vida.

Foi encaminhado pelo neuroendocrinologista para avaliação genético clínica aos oito anos e três meses de vida por apresentar baixa estatura proporcionada, deficiência do hormônio do crescimento, hipófise ectópica e dismorfias menores. Apresentava E de 106 cm (abaixo do percentil 3), P de 15 kg (abaixo do percentil 3) e PC de 49 cm (abaixo do percentil 3).

Ao exame dismorfológico apresentava baixa estatura proporcionada, hipertelorismo ocular, estrabismo divergente, orelhas grandes com pavilhão anteriorizado e hélice simplificada, narinas antevertidas, filtro longo com lábio superior fino, comissura labial com cantos voltados para baixo, dentes sépticos, hiperplasia gengival, pênis pequeno e pele seca. Apresentava atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e de aquisição da linguagem.

A avaliação cardiológica com ecocardiograma foi normal.

A RMC e RMH revelaram ectopia de hipófise.

A avaliação endocrinológica revelou hipotireoidismo e deficiência de hormônio do crescimento.

O paciente manteve acompanhamento pelo serviço de neuroendocrinologia da UNIFESP desde os oito anos de idade por apresentar deficiência do hormônio de crescimento e hipotireoidismo. Recebeu reposição de hormonal com somatotropina e acetato de leuprolida dos nove aos 18 anos de idade. Aos 18 anos de idade foi submetido à cirurgia plástica para a correção do pavilhão auricular anteriorizado.

Aos 23 anos e oito meses de idade apresentava E de 164,5 cm (entre os percentis 3 e 15), P de 71 kg; IMC de 26,3 (entre os percentis 75 e 85) e PC de 57 cm (percentil 50).



Figura 7: Fotos do paciente 4. Vista frontal do rosto aos 4 anos (a), aos 8 anos (b) e aos 23 anos de idade (c).

4.2.1.5. Paciente 5: V.H.H.P.L.

Paciente do sexo masculino (Figura 8), segundo filho de casal não consanguíneo, sendo a primeira filha normal. O genitor apresentava 29 anos e a genitora 24 anos de idade na época do nascimento do paciente.

O pré-natal transcorreu sem intercorrências com movimentos fetais normais. O paciente nasceu de parto cesáreo, a termo, com PN de 4.500 g (acima do percentil 97), CN de 50 cm (percentil 50) e PC não registrado. Ao nascimento não foram relatados desvios fenotípicos pelo neonatologista. O paciente recebeu alta do berçário aos dois dias de vida.

O paciente foi encaminhado ao geneticista pelo clínico geral da Unidade Básica de Saúde de Barueri, aos 23 anos e 10 meses de idade, para investigação de provável deficiência intelectual. O paciente não apresentou atraso do desenvolvimento motor, mas o pai refere que apresentou dificuldade de aquisição de linguagem e alteração da coordenação motora, motivo pelo qual foi encaminhado para fonoaudiólogo e para a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE). Frequentou o ambulatório da APAE por curto período de tempo, quando estava com 16 anos.

Apresentava, aos 23 anos e 10 meses de idade: E de 165,5 cm (entre os percentis 3 e 15), P de 96 kg; IMC de 35,29 (acima do percentil 97) e PC de 60 cm (acima do percentil 97). O exame dismorfológico revelou: macrocefalia, hipertelorismo ocular, orelhas grandes bilateralmente (8 cm, acima do percentil 97), ponte nasal alargada, nariz largo e achatado, filtro proeminente, lábio superior em arco de cupido, palato alto, *ulerythema ophryogenes* no rosto em volta do nariz, pescoço curto, hipermobilidade de falanges, desvio ulnar de 2° e 3° quirodáctilos e dos haluces, hiperqueratose extensa em membros, tronco e abdômen.

O ecocardiograma, a avaliação endocrinológica, a avaliação imunológica e o estudo radiológico do esqueleto foram normais.

Aos 24 anos, evidenciou-se alteração neurológica com perda de memória recente.



Figura 8: Fotos do paciente 5. Vista frontal e lateral do rosto aos 23 anos e 10 meses de idade.

4.2.2 Descrição clínica dos pacientes com anel do cromossomo 18 (Grupo II)

4.2.2.1 Paciente 6: T.A.S.

Paciente do sexo feminino (Figura 9), segunda filha de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 43 anos e a genitora 33 anos de idade, na época do nascimento da paciente, sendo que a genitora apresentou outras quatro gestações normais e um abortamento. Não há informações adicionais sobre a gestação e os genitores da paciente, pois a mesma foi adotada.

A paciente nasceu de parto normal, a termo, sem informação das condições do parto e de medidas antropométricas ao nascimento.

Apresentou atraso importante do desenvolvimento neuropsicomotor com atraso desproporcional da aquisição da linguagem. Dentre os antecedentes pessoais a mãe adotiva relata deficiência de IgA, tendência a infecção, convulsões e hepatite crônica.

O exame físico, aos 14 anos e cinco meses de idade, mostrou: E de 148,5 cm (abaixo do percentil 3), P de 47 kg; IMC de 21 (percentil 50) e PC de 53,5 cm (percentil 50).

O exame dismorfológico mostrou: baixa estatura proporcionada, fronte ampla, fâscies arredondada, hipertelorismo ocular, fenda palpebral longa bilateral oblíqua superior, epicanto bilateral, ptose palpebral bilateral, estrabismo divergente à direita, sobrancelhas ralas, nariz largo e achatado, orelhas com implantação baixa e retroposicionada à direita e com apêndice pré-auricular à direita, macrostomia, comissura labial com cantos voltados para baixo, palato alto e estreito, dentes de implantação anômala e sépticos, hipertelorismo mamário, pele seca, hiperflexibilidade de pequenas articulações, polegares de implantação baixa, persistência de almofadas digitais fetais bilateralmente nos quirodáctilos 2/3/4, sindactilia parcial cutânea 4/3 e 3/2 em quirodáctilos e hipotonia muscular global.

A avaliação cardiológica com ecocardiograma revelou valva aórtica espessada.

A avaliação oftalmológica com fundoscopia ocular foi normal.

A RMC mostrou leve dilatação do sistema ventricular supratentorial e focos de alteração de sinal na substância branca periventricular, nos núcleos semi-ovais e em topografia subcortical.



Figura 9: Fotos da paciente 6. Vista frontal e lateral direita do rosto aos 15 anos de idade.

4.2.2.2 Paciente 7: J.D.A.B.

Paciente do sexo masculino (Figura 10), segundo filho de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 25 anos e a genitora 21 anos de idade, na época do nascimento do paciente, sendo que a genitora apresentou quatro gestações e um abortamento.

A gestação foi acompanhada com pré-natal desde o início sem intercorrências. O paciente nasceu de parto normal, a termo com PN de 2.220 g (abaixo do percentil 3), CN de 36 cm (abaixo do percentil 3) e PC não registrado. Ao nascer apresentou cianose por anoxia e foi detectada hipospádia peno-escrotal, bolsa escrotal bifurcada e criptorquia bilateral pelo neonatologista que encaminhou o paciente para o endocrinologista e para o cirurgião pediátrico. Foram realizadas várias cirurgias para correção das anomalias genito-urinárias observadas, sendo que o paciente mantinha o seguimento na cirurgia infantil com uso contínuo de antibiótico-terapia profilática por causa das infecções urinárias de repetição, até a última avaliação.

Ao exame físico aos sete anos e cinco meses de idade, o paciente apresentava E de 104,7 cm (abaixo do percentil 3), P de 17,6 kg (abaixo do percentil 3) e PC de 49 cm (abaixo do percentil 3).

O exame dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, microcefalia, fâscies larga, hipertelorismo ocular, fenda palpebral oblíqua inferior, ptose palpebral bilateralmente, orelhas grandes, nariz largo e achatado, macrostomia, comissura labial com cantos voltados para baixo, eversão do lábio inferior, palato alto e estreito com fenda palatina posterior e úvula bífida, dentes de implantação anômala e sépticos, columela curta, filtro apagado,

pescoço curto, pênis pequeno, hipospádia de III grau, testículo palpável à direita e retrátil à esquerda, ânus de implantação proximal, pés largos, sulco halucal bilateral e hálux alargado.

O seguimento endocrinológico realizado desde o nascimento detectou hipotireoidismo, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Aos nove anos de idade foi detectada deficiência de hormônio de crescimento e o paciente fazia reposição diária até a data da última consulta.

A investigação imunológica revelou imunodeficiência de IgA e ausência de resposta à vacina contra pneumococo com níveis menores que 1,3 mcg/mL.

A ultrassonografia de abdômen mostrou esplenomegalia.

A RMC revelou redução da substância branca, acentuação de sulcos e fissuras discreta caracterizando sinais de anoxia perinatal e discreto afilamento de corpo caloso. A RMH foi normal.

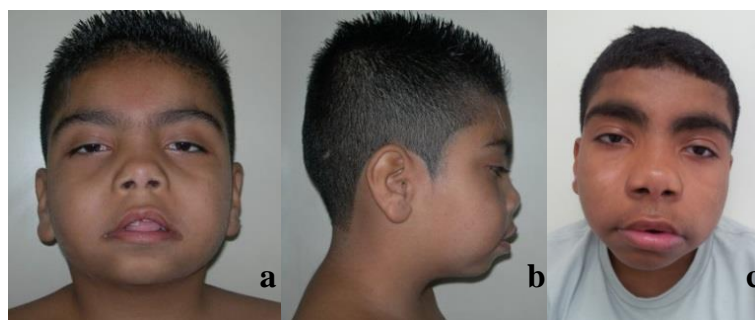


Figura 10: Fotos do paciente 7. Vista frontal e lateral do rosto aos sete anos e cinco meses (a, b) e aos 13 anos e três meses (c).

Esses pacientes com cromossomo 18 em anel foram publicados em colaboração com Guilherme et al. (2011-Apêndice 3), sendo os pacientes 6 e 7 do presente estudo os pacientes XI e IX da publicação, respectivamente; e também com Spreiz et al. (2013-Apêndice 1), sendo que os pacientes 6 e 7 do presente estudo são os pacientes 9 e 7 da publicação, respectivamente.

4.2.3 Descrição clínica dos pacientes com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo (Grupo III)

4.2.3.1 Paciente 8: D.S.N.

Paciente do sexo masculino (Figura 11), primeiro filho de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 31 anos e a genitora 26 anos de idade na época do nascimento da paciente, sendo que a genitora V Gesta, II Para e III A.

A gestação foi acompanhada com pré-natal e apresentou movimentos fetais reduzidos e fracos. O paciente nasceu de parto normal, a termo, com PN de 2.300 g (abaixo do percentil 3), CN de 47 cm (percentil 10) e PC não registrado. Ao nascimento foram observados hipospádia peno-escrotal e pés tortos congênitos. O paciente recebeu alta do berçário aos cinco dias de vida.

Durante a infância o paciente foi submetido a várias cirurgias para correção da hipospádia e para os pés tortos.

O paciente foi encaminhado ao geneticista pelo neurologista aos 32 anos de idade por deficiência intelectual não quantificada. Apresentava nesta data: E de 161 cm (abaixo do percentil 3), P de 72 kg; IMC de 22 (percentil 50) e PC de 57 cm (percentil 50).

O exame dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, hipertelorismo ocular, semi-ptose palpebral bilateralmente, estrabismo convergente à direita, orelhas grandes, nariz largo e achatado, lábio superior em arco de cupido, eversão do lábio inferior, palato alto e estreito com fenda palatina submucosa posterior, pescoço curto, pênis pequeno, hipospádia corrigida, testículo tópico à direita e retrátil à esquerda, hérnia inguinal à esquerda, pés varos com cicatrizes cirúrgicas.

O paciente faz acompanhamento com cardiologista e clínico geral por apresentar hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e esteatose hepática.

As ressonâncias magnética de crânio e de hipófise foram normais.

A avaliação endocrinológica para hormônios tireoidianos, do crescimento e sexuais foi normal.



Figura 11: Fotos do paciente 8. Vista frontal do rosto aos 32 anos de idade.

4.2.3.2 Paciente 9: S.G.F.

Paciente do sexo masculino (Figura 12), segundo filho de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 30 anos e a genitora 27 anos de idade, na época do nascimento, sendo que a genitora apresentou duas gestações e nenhum abortamento. O acompanhamento pré-natal ocorreu durante toda a gestação e houve um episódio de sangramento no primeiro trimestre tratado com cloridrato de isoxsuprina. O paciente nasceu de parto normal, pré-termo de 34 semanas com PN de 2.220 g (percentil 50), CN de 43 cm (entre os percentis 10 e 25), PC de 31 cm (entre os percentis 25 e 50) e permaneceu internado na unidade neonatal por 22 dias para investigação de fechamento precoce da sutura metópica, que foi corrigida cirurgicamente, aos cinco meses de idade.

Aos 20 meses de idade o paciente foi encaminhado para a avaliação genético clínica apresentando, nesta ocasião, E de 71 cm (abaixo do percentil 3), P de 7.750 g (abaixo do percentil 3) e PC de 42 cm (abaixo do percentil 3).

O exame dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, trigonocefalia, microcefalia, hemangioma plano na nuca, estrabismo divergente à direita, epicanto bilateral, fenda palpebral oblíqua superior, sobrancelhas esparsas, fosseta pré-auricular bilateral, raiz nasal proeminente, lábios afilados, filtro longo, palato alto, pescoço curto, clinodactilia do 5º quirodáctilo, genu valgo, sulco halucal, implantação proximal do 1º pododáctilo, pele seca e áspera e unhas hipoplásicas.

A avaliação cardiológica revelou bloqueio incompleto de ramo D e ecocardiograma normal.

A avaliação oftalmológica por fundoscopia ocular mostrou rarefação difusa inespecífica do epitélio pigmentar da retina em ambos os olhos.

As avaliações endocrinológica e imunológica foram normais.

A tomografia de crânio com um mês de vida mostrou trigonocefalia.



Figura 12: Fotos do paciente 9. Vista frontal do rosto aos 20 meses de idade.

4.2.3.3 Paciente 10: J.M.S.

Paciente do sexo masculino (Figura 13), primeiro filho de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 33 anos e a genitora 25 anos de idade na época do nascimento da paciente, sendo que a genitora apresentou três gestações e um abortamento. A irmã do paciente, incluída neste estudo como a paciente 11, apresentou quadro clínico semelhante.

O pré-natal transcorreu sem intercorrências e os movimentos fetais foram normais.

O paciente nasceu de parto cesáreo, a termo, com PN de 3.640 g (entre os percentis 50 a 75), CN de 48 cm (percentil 25) e PC não registrado. O paciente recebeu alta do berçário aos dois dias de vida e foi encaminhado ao geneticista pelo neurologista, aos 19 meses de idade, por deficiência de crescimento, atraso do desenvolvimento neuro-psicomotor e desvios fenotípicos para investigação etiológica.

A mãe relata que o paciente apresentava infecções respiratórias de repetição desde o nascimento. Apresentava aos 19 meses de idade: E de 78 cm (entre os percentis 3 e 15), P de 10,5 kg (entre os percentis 3 e 15) e PC de 46 cm (percentil 15).

O exame dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, microcefalia, sobrancelhas rarefeitas, hipertelorismo ocular, ptose palpebral bilateralmente, fendas palpebrais oblíquas inferiores bilateralmente, pregas epicânticas bilateralmente, orelhas grandes rodadas posteriormente e de implantação baixa, ponte nasal alargada, nariz largo e achatado, hipotonia orofacial, macrostomia, lábios grossos com comissura labial com cantos voltados para baixo, eversão do lábio inferior, palato alto e estreito, pescoço curto, fimose, testículos tópicos bilateralmente e unhas dos pés hipoplásicas.

O paciente abandonou o seguimento no ambulatório de genética médica por 16 anos e foi reavaliado aos 18 anos e quatro meses, com: E de 153 cm (abaixo do percentil 3), P de 70 kg; IMC de 29,9 (entre os percentis 85 e 97) e PC de 53,5 cm (percentil 50) apresentando, além das dismorfias descritas anteriormente, cifoescoliose, hiperqueratose pilar na fronte, nasal, tórax e região alta do dorso, comedões nasais, hiperpigmentação na face interna das coxas e região inguinal e *tinea pedis*. Recebeu tratamento dermatológico com adapaleno 0,1%, cetozonazol creme 2% e óxido de zinco para as lesões descritas.

A avaliação endocrinológica mostrou sinais de hipotireoidismo subclínico e o paciente mantinha acompanhamento no ambulatório de endocrinologia até a data da última avaliação.

A avaliação das imunoglobulinas séricas foi normal (Tabela 3).

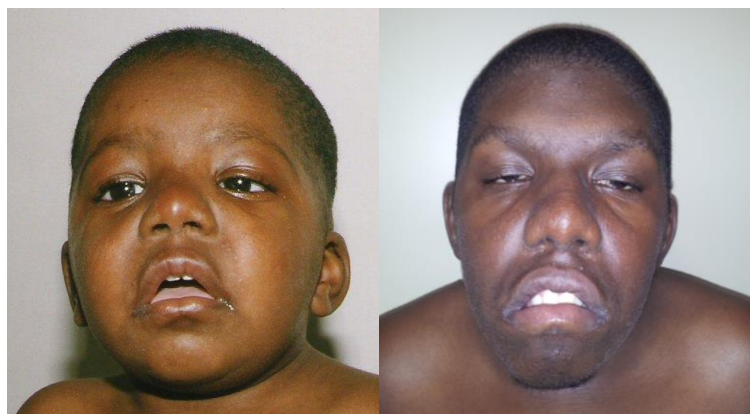


Figura 13: Fotos do paciente 10. Vista frontal do rosto aos 19 meses e aos 18 anos de idade.

4.2.3.4 Paciente 11: R.V.S.

Paciente do sexo feminino (Figura 14), segunda filha de casal não consanguíneo, irmã do Paciente 10 (Figura 13). O genitor apresentava 42 anos e a genitora 36 anos de idade na época do nascimento, sendo que a genitora apresentou três gestações e um abortamento, representados no heredograma da Figura 12.

A gestação foi acompanhada por pré-natal e a mãe referiu movimentos fetais com frequência e vigor diminuídos. A paciente nasceu de 41 semanas e 1/7 de parto cesáreo, idade gestacional, com PN de 3.795 g (entre os percentis 50 e 75), CN de 49 cm (entre os percentis 25 e 50) e PC de 34 cm (percentil 50). Ao nascimento foi solicitado o cariótipo por bandamento G em função da alteração cromossômica do irmão, porém não há relato de suspeita de alteração cromossômica descrita pelo neonatologista. A paciente recebeu alta do berçário aos dois dias de vida.

A primeira avaliação genética foi aos seis meses de idade por apresentar deficiência de ganho pondero-estatural e dismorfias menores. Apresentava aos seis meses de idade: E de 64,5 cm (entre os percentis 15 e 50), P de 6.700 g (entre os percentis 15 e 50) e PC de 39 cm (abaixo do percentil 3).

O exame dismorfológico mostrou: microcefalia, hipertelorismo ocular, ptose palpebral bilateralmente, epicanto, fendas palpebrais oblíquas inferiores bilateralmente, fosseta pré-auricular à esquerda, orelhas com baixa implantação, comissuras da boca inclinadas para baixo, pescoço curto, hérnia umbilical, braquidactilia dos quirodáctilos, clinodactilia o 5º quirodáctilo bilateralmente e hipoplasia ungueal dos pododáctilos.

Aos seis anos e sete meses de idade: E de 101 cm (abaixo do percentil 3), P de 18 kg (entre os percentis 3 e 15) e PC de 49 cm (percentil 50). O exame dismorfológico, nesta idade, revelou: hipotonia muscular global, baixa estatura proporcionada, microcefalia, fâscies larga e

hipoexpressiva, epicanto bilateralmente, hipertelorismo ocular, ptose palpebral bilateral, fendas palpebrais com inclinação para baixo, pequena região hipocrômica em região de raiz nasal à direita, nariz largo e achatado, orelhas grandes, fosseta pré-auricular à esquerda, macrostomia, eversão do lábio inferior, comissura labial com cantos voltados para baixo, palato alto e estreito, atraso da dentição, cáries dentárias, orelhas grandes com rotação posterior, pescoço curto, hipertelorismo mamário, clinodactilia de 2º e 5º quirodáctilos, hipoplasia ungueal acentuada nos pés, sindactilia parcial cutânea 2/3/4 em pododáctilos bilateralmente e sulco vertical na planta dos pés bilateralmente.

Os pacientes 10 e 11 desse estudo foram publicados em colaboração com Guilherme et al. (2014-Apêndice 3), sendo que correspondem aos pacientes 4 e 5 da publicação, respectivamente.

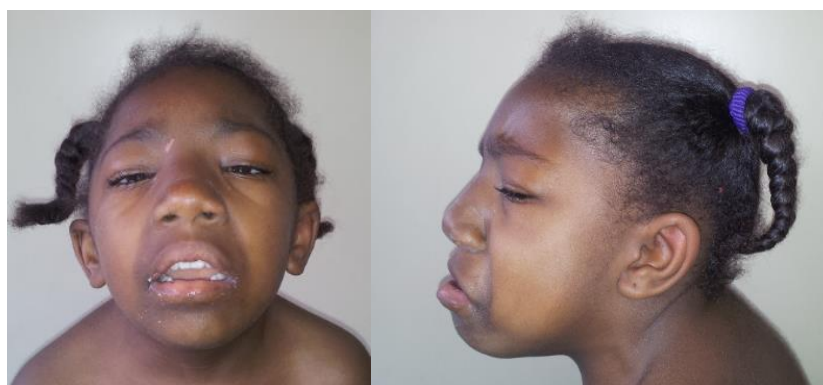


Figura 14: Fotos da paciente 11. Vista frontal e lateral esquerda do rosto aos seis anos e sete meses de idade.

4.2.3.5 Paciente 12: P.L.S.

Paciente do sexo masculino (Figura 15), filho único de casal não consanguíneo. O genitor apresentava 26 anos e a genitora 41 anos de idade na época do nascimento do paciente, sendo que a genitora apresentou cinco gestações e um abortamento desta união e três gestações de união anterior, com três filhas normais.

O pré-natal transcorreu sem intercorrências com movimentos fetais normais. O paciente nasceu de parto normal, a termo, com PN de 2.640 g (entre os percentis 3 e 10), CN de 46 cm (abaixo do percentil 3) e PC não registrado. Ao nascimento não foram relatados desvios fenotípicos pelo neonatologista. O paciente recebeu alta do berçário aos dois dias de vida.

O paciente foi encaminhado ao geneticista pelo nutrólogo aos 27 meses de idade por deficiência de crescimento e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor para investigação.

O paciente apresentava, aos 27 meses de idade, E de 81 cm (abaixo do percentil 3), P de 10 kg (abaixo do percentil 3) e PC de 46 cm (percentil 3).

O exame dismorfológico revelou: baixa estatura proporcionada, hipotricose de sobrancelhas, estrabismo convergente à direita, ptose palpebral bilateral, fendas palpebrais estreitas, orelhas grandes com pavilhão simplificado e anteriorizado, ponte nasal alargada, nariz largo e achatado, lábios grossos com comissura labial com cantos voltados para baixo, palato alto, pescoço curto, fimose, testículos no canal inguinal bilateralmente e unhas dos pés hiperconvexas e hipoplásicas.

O ecocardiograma, avaliação endocrinológica e estudo radiológico do esqueleto pedidos nesta época foram normais.

Aos seis anos e quatro meses apresentava: E de 105 cm (abaixo do percentil 3), P de 16,9 kg (percentil 15) e PC de 48 cm (abaixo do percentil 3) apresentando, além das dismorfias descritas anteriormente, microcefalia, cabelos grossos e filtro apagado.

Aos 21 anos e três meses de vida, apresentava: E de 159 cm (abaixo do percentil 3), P de 62 kg; IMC de 24,50 (entre os percentis 50 e 85) e PC de 54 cm (percentil 50) e, além das dismorfias descritas anteriormente, hipotonia muscular global moderada, ptose palpebral bilateralmente, sialorréia intensa, hipotonia orofacial, cifose torácica e hiperqueratose pilar observada em tronco e membros.



Figura 15: Foto do paciente 12. Vista frontal do rosto aos 21 anos e três meses de idade.

A Tabela 3 resume os achados clínicos mais prevalentes nos pacientes do grupo I da presente amostra (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo I

Paciente	1	2	3	4	5	presente/total
Sexo	F	F	F	M	M	
Pontos de quebra	18p11.23	18p11.21	18p11.21	18p11.21	18p11.23	
Peso ao nascer (g)	2160	3000	1720	3140	4500	
Comprimento ao nascer (cm)	44	48	NA	50	50	
Baixo peso ao nascer	-	-	+	-	-	1 / 5
Baixa estatura	-	-	+	-	-	1 / 5
Perímetro cefálico alterado	-	-	+	-	+	2 / 5
Deficiência intelectual	NA	+	+	+	+	4 / 4
Atraso desproporcional da linguagem	-	+	+	+	+	4 / 5
Lentidão	-	+	+	+	+	4 / 5
Hipotonia muscular	+	+	+	-	-	3 / 5
Convulsões	-	-	-	+	-	1 / 5
Microcefalia	-	-	+	-	-	1 / 5
Macrocefalia	-	-	-	-	+	1 / 5
Malformação do SNC	NA	-	-	+	-	1 / 4
Holoprosencefalia	-	-	-	-	-	0 / 5
Incisivo central único	-	-	-	-	-	0 / 5
Malformação cardíaca	+	+	-	-	-	2 / 5
Diabetes mellitus	-	-	-	-	-	0 / 5
Hipotiroidismo	-	+	+	+	-	3 / 5
Hipo ou ausência de IgA	-	-	-	-	-	0 / 5
Tendência à infecção	+	+	+	+	-	4 / 5
Fáscies arredondada	+	+	-	+	+	4 / 5
Fáscies hipopressiva	+	+	+	+	+	5 / 5
Ptose	-	+	+	-	-	2 / 5
Hipertelorismo ocular	+	+	+	+	+	5 / 5
Estrabismo	+	+	+	+	+	5 / 5
Epicanto	+	+	+	+	+	5 / 5
Inclinação da fenda palpebral para baixo ou para cima	+	+	+	-	-	3 / 5
Nariz largo	+	+	+	+	+	5 / 5
Macrostomia	-	+	-	+	+	3 / 5
Eversão do lábio inferior	+	+	-	+	+	4 / 5
Inclinação para baixo das comissuras labiais	+	+	+	+	-	4 / 5
Pálato alto e estreito	+	+	+	+	+	5 / 5
Atraso da erupção dentária/ Dentes irregulares	NA	+	+	+	NA	3 / 3
Cáries dentárias	+	+	+	+	+	5 / 5
Orelhas grandes e/ou pavilhão anteriorizado	-	+	+	+	+	4 / 5
Rotação posterior das orelhas	+	+	+	+	-	4 / 5
Pescoço curto ou largo	+	+	+	+	+	5 / 5
Hipertelorismo mamário	+	+	+	+	+	5 / 5
Escoliose e/ou cifose	-	+	+	+	-	5 / 5
Mão largas e dedos curtos	+	+	-	+	-	3 / 5
Lábios menores grandes	-	-	-			0 / 3
Genital masculino hipoplásico				+	-	1 / 2

SNC: sistema nervoso central; M: masculino; F: feminino; NA: não avaliado; Vazio: não se aplica; +: presente; -: ausente.

A Tabela 4 resume os achados clínicos observados nos pacientes do grupo II da presente amostra (Tabela 4).

Tabela 4 - Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo II

Paciente	6	7	presente/total
Sexo	F	M	
Pontos de quebra	18p11.21 18q23	18p11.32 18q22.1	
Peso ao nascer (g)	NA	2200	
Comprimento ao nascer (cm)	NA	NA	
Baixo peso ao nascer	NA	+	1 / 1
Baixa estatura	+	+	1 / 2
Perímetro cefálico alterado	-	+	1 / 2
Deficiência intelectual	+	+	2 / 2
Atraso desproporcional da linguagem	+	+	2 / 2
Lentidão	+	+	2 / 2
Hipotonia muscular	+	+	2 / 2
Convulsões	+	-	1 / 2
Microcefalia	-	+	1 / 2
Macrocefalia	-	-	2 / 2
Malformação do SNC	NA	-	0 / 2
Holoprosencefalia	-	-	0 / 2
Incisivo central único	-	-	0 / 2
Malformação cardíaca	+	+	2 / 2
Diabetes mellitus	-	-	0 / 2
Hipotiroidismo	+	+	1 / 2
Deficiência de IgA	+	+	2 / 2
Tendência a infecção	+	+	2 / 2
Fácies arredondada	+	+	2 / 2
Fácies hipoexpressiva	+	+	2 / 2
Ptose	+	+	2 / 2
Hipertelorismo ocular	+	+	2 / 2
Estrabismo	+	+	2 / 2
Inclinação das fendas palpebrais: para cima ou para baixo	+	+	2 / 2
Nariz largo	+	+	2 / 2
Macrostomia	+	+	2 / 2
Eversão do lábio inferior	+	+	2 / 2
Inclinação para baixo das comissuras labiais	+	+	2 / 2
Pálato alto e estreito	+	+	2 / 2
Pálato fendido		+	1 / 2
Atraso da erupção dentária/ dentes irregulares	+	+	2 / 2
Cáries dentárias	+	+	2 / 2
Incisivos centrais anormais	-	-	0 / 2
Orelhas grandes e/ou com pavilhão anteriorizado	-	+	1 / 2
Rotação posterior das orelhas	+	+	2 / 2
Pescoço curto ou largo	-	+	1 / 2
Hipertelorismo mamário	+	+	2 / 2
Escoliose e/ou cifose	-	-	0 / 2
Mãos largas e dedos curtos	-	+	1 / 2
Lábios menores grandes	-		0 / 1
Genital masculino hipoplásico		+	1 / 1

SNC: sistema nervoso central; M: masculino; F: feminino; NA: não avaliado; Vazio: não se aplica; +: presente;

-: ausente.

A Tabela 5 resume os achados clínicos que foram observados nos pacientes do grupo III (Tabela 5).

Tabela 5 - Principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes do Grupo III

Paciente	8	9	10	11	12	presente/total
Sexo	M	M	M	F	M	
Pontos de quebra	16q23.3 18p11.31	5q34 18p11.31	9p13.1 18p11.31	9p13.1 18p11.31	18p11.21 21q11.2	
Peso ao nascer (g)	2300	2220	3640	3755	2620	
Comprimento ao nascer (cm)	47	43	48	49	46	
Baixo peso ao nascer	+	+	-	-	+	3 / 5
Baixa estatura	+	+	+	+	+	5 / 5
Perímetro cefálico alterado	-	+	-	-	-	1 / 5
Deficiência intelectual	+	+	+	+	+	5 / 5
Atraso desproporcional da linguagem	+	+	+	+	+	5 / 5
Lentidão	+	-	+	+	+	4 / 5
Hipotonia muscular	-	-	+	+	+	3 / 5
Convulsões	-	-	-	-	-	0 / 5
Microcefalia	-	+	-	-	-	1 / 5
Macrocefalia	-	-	-	-	-	0 / 5
Malformação do SNC	-	+	NA	NA	NA	1 / 2
Holoprosencefalia	-	-	NA	NA	NA	1 / 2
Incisivo central único	-	-	-	-	-	0 / 5
Malformação cardíaca	-	-	+	NA	-	1 / 4
Diabetes mellitus	-	-	-	-	-	0 / 5
Hipotireoidismo	+	-	-	-	-	1 / 5
Deficiência de IgA	-	-	-	-	-	0 / 5
Tendência a infecção	-	-	+	+	-	2 / 5
Fácies arredondada	+	-	+	+	-	2 / 5
Fácies hipoexpressiva	+	+	+	+	+	5 / 5
Ptose	+	-	+	+	+	4 / 5
Hipertelorismo ocular	+	-	+	+	+	4 / 5
Estrabismo	+	+	+	+	+	5 / 5
Epicanto	+	+	+	+	+	5 / 5
Inclinação da fenda palpebral: para cima ou para baixo	+	+	+	+	-	4 / 5
Nariz largo	+	-	+	+	+	4 / 5
Macrostomia	+	-	+	+	+	4 / 5
Eversão do lábio inferior	+	-	+	+	+	4 / 5
Inclinação para baixo da comissura labial	+	-	+	+	+	4 / 5
Pálato alto e estreito	+	+	+	+	+	5 / 5
Atraso na erupção dentária/ dentes irregulares	NA	+	+	+	+	4 / 4
Cáries	-	-	+	+	+	4 / 5
Orelhas grandes e/ou pavilhão anteriorizado	+	-	+	+	+	4 / 5
Rotação posterior das orelhas	+	+	+	+	-	4 / 5
Pescoço curto	+	+	+	+	+	5 / 5
Hipertelorismo mamário	-	-	+	+	+	3 / 5
Escoliose e/ou cifose	-	-	+	+	+	3 / 5
Mãos largas e dedos curtos	+	-	+	+	-	2 / 5
Lábios menores grandes				-		0 / 1
Genital masculino hipoplásico	+	-	-		-	1 / 4

SNC: sistema nervoso central; M: masculino; F: feminino; NA: não avaliado; Vazio: não se aplica; +: presente; -: ausente.

4.3 Avaliação Radiológica

Do total de 12 pacientes deste estudo, seis (pacientes 2, 3, 4, 6, 7 e 8) realizaram a ressonância magnética de crânio e cinco a ressonância magnética de hipófise (pacientes 2, 3, 4, 7 e 8), sendo que apenas o paciente 4 apresentou hipófise ectópica e os restantes (pacientes 2, 3, 7 e 8) apresentaram a ressonância magnética de hipófise normal.

A ressonância magnética de crânio desses pacientes (2, 3, 4, 6, 7 e 8) revelou principalmente sinais de alteração da substância branca em diferentes regiões cerebrais.

Na paciente 2 observamos áreas de alteração de sinal com preferência periventricular, coroa radiada e centros semi-ovais bilateralmente e outros focos esparsos por todo o encéfalo, com predomínio em substância branca.

Na paciente 3 observamos focos de hypersinal na substância branca e no tálamo.

A paciente 6 apresentou leve dilatação do sistema ventricular supratentorial, focos de alteração de sinal na substância branca nas regiões periventricular, centros semi-ovais e subcortical.

O paciente 7 apresentou acentuação difusa dos sulcos, fissuras e cisternas encefálicas.

O paciente 8 apresentou focos de hypersinal na substância branca periventricular e subcortical em ambos os hemisférios cerebrais, além de focos de alteração de sinal na região periventricular e região subcortical de aspecto inespecífico, podendo ser decorrente de gliose/rarefação mielínica.

4.4 Avaliação Neuropsicológica

A avaliação neuropsicológica, baseada em medidas de desempenho intelectual e em escalas para avaliação de habilidades adaptativas e problemas comportamentais, foi realizada em todos os pacientes; os procedimentos usados foram definidos de acordo com a faixa etária e a capacidade do indivíduo em compreender as instruções das tarefas.

Nos pacientes 1 e 9, em função da pouca idade, foram realizadas apenas a avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor pelo teste de triagem de desenvolvimento Denver II (Drachler et al., 2007) e a avaliação do comportamento adaptativo pela escala Vineland II (Sparrow et al., 1984).

A avaliação neuropsicológica da paciente 1, aos três anos de idade, revelou aquisições compatíveis com a faixa etária nos domínios cognitivos relacionados ao desenvolvimento simbólico, linguagem oral expressiva e compreensiva e praxias (psicomotricidade ampla), com maior atraso em motricidade fina.

A avaliação do paciente 9, aos três anos de idade, revelou aquisições compatíveis com a faixa etária no desenvolvimento motor fino adaptativo e motor grosseiro, mas o desenvolvimento nos domínios da linguagem e pessoal/social foi classificado como abaixo dos parâmetros etários de sua faixa etária. Quanto à linguagem expressiva, por ocasião da avaliação, o paciente falava apenas palavras isoladas para indicar o que queria, mas em termos da compreensão, demonstrou ter bom entendimento das solicitações verbais.

Nos pacientes 7, 10 e 11, embora com idades adequadas para o uso das escalas de desempenho intelectual, não foi possível obter uma quantificação precisa do QI, uma vez que em função do nível de comprometimento cognitivo global, eles não compreendiam as instruções das tarefas e não se mantinham em sua execução. Foi possível, portanto, concluir uma investigação psicométrica por meio das escalas WISC-III e WAIS-III em sete casos, que estão resumidos na tabela 6.

No que concerne aos aspectos neuropsicológicos, com base nos dados obtidos com os sete pacientes da presente amostra e que puderam ser quantificados (pacientes 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 12), observamos que o QIT variou de 59 a 83 (QIT médio 66,57; desvio padrão 10,99); o QIV variou de 60 a 86 (QIV médio 71,42; desvio padrão 12,36); o QIE variou de 66 a 81 (QIE médio 68,57; desvio padrão 9,32). Uma discrepância significativa (18 pontos de diferença) entre o desempenho dos QIs referentes aos domínios da cognição verbal e não verbal foi verificada em apenas um caso (paciente 8) (Tabela 7).

Quanto aos resultados, em cada subteste isoladamente, encontrou-se melhor desempenho em Semelhanças (nota ponderada média 6; desvio 1,78) e Raciocínio Matricial (nota ponderada média 6; desvio 1), seguidos de Arranjo de Figuras (nota ponderada média 5,83; desvio 1,41).

O subteste no qual os pacientes apresentaram maior dificuldade foi Compreensão (nota ponderada média 3,83; desvio 1,32). Os subtestes Semelhanças e Raciocínio Matricial são associados a capacidades de estabelecer relações lógicas entre conceitos verbais e não verbais, respectivamente. O subteste Arranjo de Figuras investiga habilidades de análise perceptiva em situação social. O subteste Compreensão investiga especialmente conhecimento de regras de relacionamento social (Simões, 2002).

Em relação à investigação das habilidades adaptativas, realizadas conforme análise quantitativa das respostas da família ao inventário Vineland-II, foi possível obter informações em nove casos, sendo que os resultados estão descritos na tabela 7.

Tabela 6 - Avaliação neuropsicológica realizada nos pacientes com a medida de desempenho intelectual e subtestes

Paciente	Idade (anos)	Escore de QI			Vocabulário	Semelhanças	Aritmética	Dígitos	Informação	Compreensão	Completar figuras	Códigos	Cubos	Raciocínio matricial	Arranjo de figuras
		QIT	QIV	QIE											
2	11	59	60	66	6	4	3	4	1	4	6	5	5	NC	4
3	23	63	67	64	2	4	4	3	5	4	4	5	5	5	6
4	25	77	79	77	4	8	6	6	5	6	6	7	6	6	8
5	24	83	86	81	6	8	8	11	8	4	5	8	7	7	7
6	16	50	53	53	5	4	1	3	1	3	7	1	1	NC	4
8	34	66	84	73	4	6	3	1	6	2	3	4	6	7	5
12	20	68	71	66	5	6	5	4	6	4	4	2	6	5	5

QI: quociente de inteligência; QIT: quociente de inteligência total; QIV: quociente de inteligência verbal; QIE: quociente de inteligência de execução; NC: não consta da escala WISC-III

Tabela 7 – Resultados da avaliação das habilidades adaptativas da presente amostra conforme índices globais (escore padrão) e subdomínios (nota ponderada) obtidos na escala Vineland II

Paciente	2	3	4	5	6	8	10	11	12		
Vineland										Min-Max	Média (SD)
Comunicação	65	21	51	25	57	21	59	49	43	25-65	43,67 (15,56)
Receptiva	11	7	10	4	7	7	9	7	6	4-11	7,50 (3,54)
Expressiva	8	6	12	9	5	7	9	7	4	4-12	7,33 (2,83)
Escrita	7	2	7	9	8	7	6	7	4	2-9	6,17 (2,12)
Atividades de vida diária	63	46	49	81	48	46	57	46	43	43-81	55,00 (14,14)
Pessoal	9	8	8	16	6	6	9	8	3	3-16	8,33 (4,24)
Doméstico	10	8	7	11	3	6	88	8	4	3-11	7,17 (4,24)
Comunidade	6	2	6	11	5	6	3	4	4	2-11	5,67 (1,41)
Socialização	80	40	62	77	58	52	58	66	51	40-80	62,33 (20,51)
Interpessoal	13	6	9	11	9	5	5	10	7	6-13	9,17 (4,24)
Lazer	8	5	9	12	2	9	5	8	4	2-12	6,67 (2,83)
Habilidades adaptativas	13	10	11	13	10	2	11	9	5	5-13	10,33 (5,66)
Habilidades motoras	67	74	72	70	94	68	75	59	70	67-94	74,50 (2,12)
Grossas	8	16	12	14	15	13	8	9	11	8-16	12,67 (2,12)
Finas	11	8	11	8	13	8	14	7	9	8-13	10,00 (1,41)

Os dados obtidos na escala Vineland-II indicam, assim, melhor desempenho na amostra como um todo, nos domínios da motricidade e das habilidades sociais. O domínio da comunicação foi aquele no qual os pacientes mostraram o maior grau de imaturidade, com maior fragilidade em linguagem escrita.

Por fim, apresentam-se os dados referentes às respostas da família ao inventário comportamental CBCL e resumidos na tabela 8 (Tabela 8). Embora esse inventário seja destinado a crianças e adolescentes entre 6 e 18 anos de idade, ele foi utilizado no presente estudo em todos os pacientes, independentemente da idade, para uma reflexão a respeito da presença de possíveis problemas comportamentais, como dos tipos internalizante (ansiedade, retraimento/depressão, queixas somáticas) e externalizante (violação de regras e agressividade) (Tabela 8).

Tabela 8 - Problemas comportamentais na amostra de pacientes com deleção 18p, conforme resultados no inventário CBCL (em t-escore)

Paciente	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12
Ansiedade	67	70*	50	57	78*	70*	54	54	57	51
Retraimento/depressão	56	74*	50	53	60	75*	63	63	64	70*
Queixas somáticas	57	74*	50	58	56	67	54	61	57	56
Problemas de socialização	59	69	61	66	70*	69	67	70*	63	68
Problemas de pensamento	51	67	59	50	69	67	55	55	61	67
Problemas de atenção	32	63	65	61	63	62	52	57	64	63
Violação de regras	52	62	50	57	54	57	54	54	51	60
Agressividade	57	61	50	55	69	66	51	54	68	59

(*) Nível clínico: t-score ≥ 70

No inventário comportamental CBCL, sob ponto de vista clínico, t-escores iguais ou maiores que 70 identificam os problemas comportamentais, como por exemplo, a paciente 3, apresentou problemas comportamentais internalizantes relacionados a ansiedade, retraimento/depressão e queixas somáticas.

A paciente 6 apresentou ansiedade e problemas de socialização. O paciente 7 apresentou ansiedade e retraimento/depressão. O paciente 10 apresentou problemas de socialização e o paciente 12 retraimento/depressão (Tabela 8).

4.5 Avaliação Imunológica

Os níveis de imunoglobulinas séricas foram comparados com valores padronizados de acordo com a faixa etária. O critério de resposta adequada ao pneumococo foi definido como concentração de anticorpos pós-imunização $\geq 1,3$ mcg/mL ou um incremento de quatro vezes do valor pós em relação ao pré a pelo menos 50% dos sorotipos testados (Sorensen et al., 1998). Todos os pacientes foram imunizados ao pneumococo.

As dosagens das imunoglobulinas A, G e M foram realizadas em 12 pacientes (Tabela 9, figura 16). Em apenas sete deles (58%), os níveis das imunoglobulinas estavam normais para a idade. Os pacientes 2 e 8 apresentaram níveis elevados de IgA (acima do percentil 97). O paciente 4 apresentou níveis reduzidos de dois isotipos (G e M). A paciente 6 apresentou níveis reduzidos de dois isotipos (A e M), mas não foram realizados estudos mais detalhados para confirmar as deficiências de IgA e IgM, pois perdemos o contato com a paciente. O paciente 7 apresentou critérios suficientes para caracterização de deficiência de IgA, com níveis menores que 7 mg/dL (Tabela 9 e Figura 16).

Com relação à produção de anticorpos a antígenos proteicos, cinco pacientes (1, 2, 7, 8 e 9) foram avaliados. Destes, quatro pacientes (1, 2, 8 e 9) apresentaram resposta positiva (IgG) para rubéola. O paciente 7 que apresentou resposta negativa para rubéola foi o mesmo paciente com critério para deficiência de IgA.

A produção de anticorpo a antígenos polissacarídeos foi avaliada após imunização em cinco pacientes (2, 4, 7, 8 e 9). Observamos que três pacientes (2, 8 e 9) apresentaram resposta positiva a mais que 50% dos sorotipos testados, sendo considerada normal. Em dois pacientes (4 e 7) a resposta foi diminuída para os sorotipos testados (40%). O paciente 4 apresentou resposta inadequada em quatro (57%) dos sete sorotipos testados, sendo este resultado considerado como resposta parcial e o paciente está sendo monitorado em relação à frequência de infecções de repetição, com recomendação de uso de antibioticoterapia profilática. O paciente 7 apresentou ausência de resposta à vacina do pneumococo com níveis $<1,3$ mcg/mL para todos os sorotipos testados e manteve o monitoramento em relação à frequência de infecções de repetição, com recomendação de uso de antibioticoterapia profilática até a data da última avaliação. Como esse paciente também apresenta infecção urinária de repetição, consideramos que o quadro pode estar relacionado também à presença de malformação genito-urinária e cirurgias consecutivas para correção.

O estudo de complemento hemolítico total foi realizado em cinco pacientes e nenhuma deficiência de complemento foi encontrada. O número de linfócitos T mostrou-se normal nos

quatro pacientes avaliados (2, 7, 8 e 9). Apenas o paciente 9 realizou todas as avaliações imunológicas solicitadas e todas as avaliações foram normais. Os níveis séricos das imunoglobulinas encontrados estão resumidos na tabela 7 com os respectivos percentis em relação à idade (Tabela 9).

Tabela 9 - Dosagem de Imunoglobulinas séricas dos pacientes

Pacientes	Idade (anos)	Imunoglobulinas séricas		
		IgG	IgM	IgA
1	2,4	787,7 mg/dL(p50-75)	95,5 mg/dL (p50)	60,7 mg/dL (p50-75)
2	11	1226 mg/dL (p75-97)	156 mg/dL (p75-97)	202 mg/dL (>p97)
3	23	1229 mg/dL (p75-97)	180 mg/dL (p75-97)	176 mg/dL (p50)
4	25	580 mg/dL (< p3)	18 mg/dL (< p3)	231 mg/dL (p50)
5	24	906 mg/dL (p50-75)	85 mg/dL (p50)	103 mg/dL (p 50)
6	17	689 mg/dL (p50)	16,5 mg/dL (< p3)	< 50 mg/dL (< p3)
7	13	1349 mg/dL(p75-97)	87 mg/dL (p50)	< 10 mg/dL (< p3)
8	35	1565 mg/dL (p75)	145 mg/dL (p75)	694,3 mg/dL (>p97)
9	3	908 mg/dL (p50-75)	91 mg/dL (p25-50)	129 mg/dL (p75-90)
10	18	1307 mg/dL (p75-97)	115 mg/dL (p75)	187 mg/dL (p75-90)
11	7	1292 mg/dL (p75-97)	130 mg/dL (p75)	96 mg/dl (p50)
12	20	1058 mg/dL (p50)	117 mg/dL (p75)	285 mg/dL (p75-90)

IgG-imunoglobulina G; IgM-imunoglobulina M; IgA-imunoglobulina A; em negrito os resultados alterados

Na figura 16 estão representados os mesmos valores da tabela 9 em relação à idade dos pacientes, onde os pacientes maiores que 12 anos estão representados à extrema direita das curvas. As dosagens séricas dos pacientes foram também representadas nas curvas de normalidade das imunoglobulinas séricas para a população brasileira para melhor visualização dos resultados (figura 16).

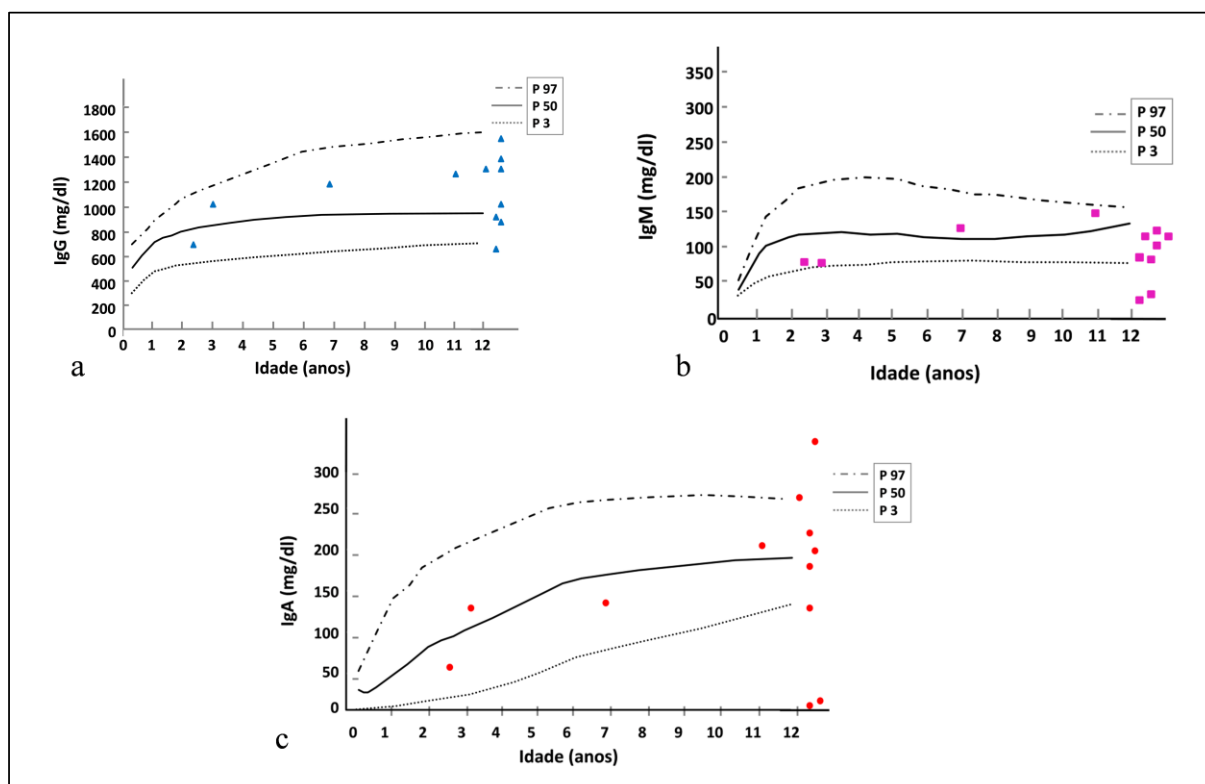


Figura 16: Representação gráfica da tabela 9. Observamos em triângulos azuis a IgG em (a); em quadrados rosas a IgM em (b); em pontos vermelhos a IgA em (c). A representação gráfica permite observar a grande variedade de alterações das imunoglobulinas séricas em relação à idade e a variação normal representada pelas linhas em percentis.

4.6 Avaliação Citogenética e Molecular

Os resultados da avaliação citogenética e molecular encontram-se a seguir.

4.6.1 Pacientes com deleção pura (Grupo I)

4.6.1.1 Paciente 1: A.C.P.I.

A paciente 1 apresenta uma deleção pura 18pter→p11.23, decorrente de um derivado da translocação equilibrada t(8;18) presente no pai. Os resultados das análises citogenéticas e moleculares encontram-se na figura 17.

O *array* da paciente mostrou uma deleção de 8,1 Mb do braço curto do cromossomo 18, não havendo alteração no cromossomo 8, embora o pai apresente a translocação envolvendo os cromossomos 8 e 18.

O resultado do estudo citogenético-molecular da paciente foi dado como 46,XX,der(18),t(8;18)(p23;p11.23)pat.arr[hg19]18p11.32p11.23(11,542-8,156,545)×1.

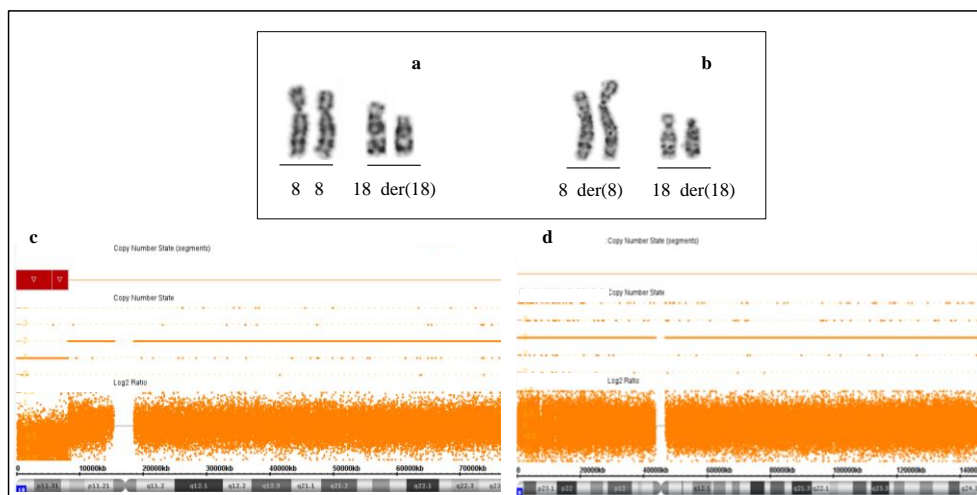


Figura 17: Cariótipo parcial sob bandamento G da paciente 1, do pai da paciente 1 e array genômico parcial dos cromossomos 18 e 8 da paciente 1. Observamos os cromossomos 8 normais e os cromossomos 18, um normal e o outro com a deleção do braço curto da paciente 1 em (a); a translocação equilibrada entre os braços curtos dos cromossomos 8 e 18 no cariótipo do pai da paciente 1 em (b); a deleção de 8,1Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.23 em (c) e a ausência de duplicação ou deleção do cromossomo 8 na paciente 1 em (d).

4.6.1.2 Paciente 2: D.A.B.

A paciente apresenta uma deleção pura de 12,3 Mb envolvendo as bandas 18pter→p11.2, conforme apresentado na figura 18.

O resultado do estudo citogenético-molecular foi dado como: 46,XX,del(18)(p11.2)dn.arr[hg19]18p11.32p11.21(1,542-12,325,158)×1.

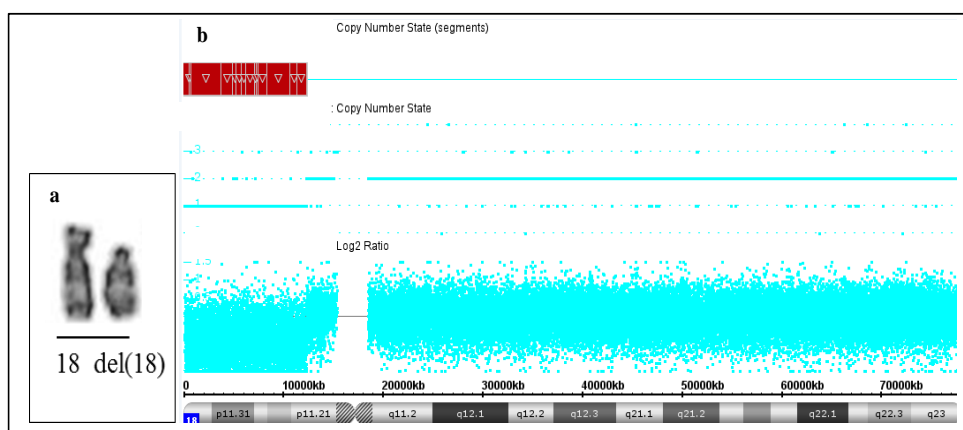


Figura 18: Cariótipo parcial sob bandamento G e array genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 2. Observamos o cromossomo 18 normal e cromossomo 18 com deleção do braço curto em (a) e a deleção de 12,3 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21 em (b).

4.6.1.3 Paciente 3: M.L.S.

A paciente apresenta uma deleção pura de 15 Mb envolvendo as bandas 18pter → p11.21 e a duplicação de 680 kb na banda 18q12.1 conforme apresentado na figura 19.

O resultado do estudo citogenético-molecular foi dado como: 46,XX,del(18)(p11.21)dn.arr[hg19]18p11.32p11.21(434,686-15,133,714)×1, 18q12.1(27,397,123-28,076,687)×3.

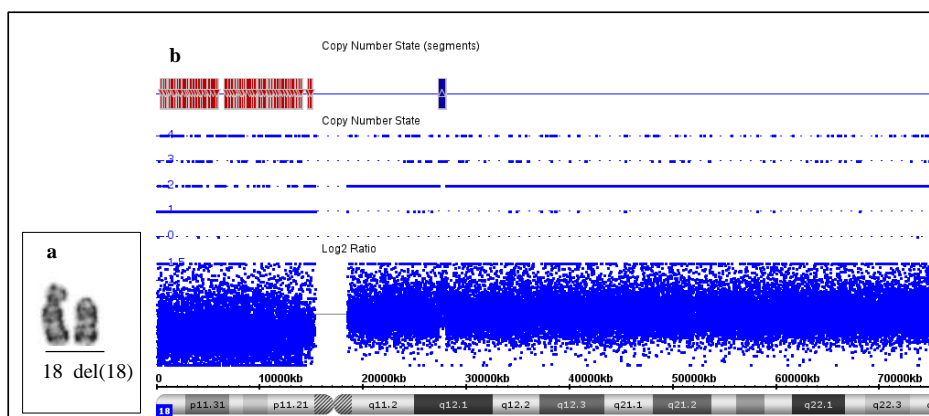


Figura 19: Cariótipo parcial sob bandamento G e *array* genômico parcial do cromossomo 18 da paciente 3. Observam-se o cromossomo 18 normal e cromossomo 18 com deleção do braço curto em (a) e a deleção de 15 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21 e duplicação de 680 kb na banda 18q12.1 em (b).

4.6.1.4 Paciente 4: L.B.L.

O paciente apresenta uma deleção pura de 15 Mb envolvendo as bandas 18pter → p11.21, conforme apresentado na figura 20.

O resultado do estudo citogenético-molecular foi dado como: 46,XY,del(18)(p11.2)dn.arr[hg19]18p11.32p11.21(11,542-15,092,474)×1

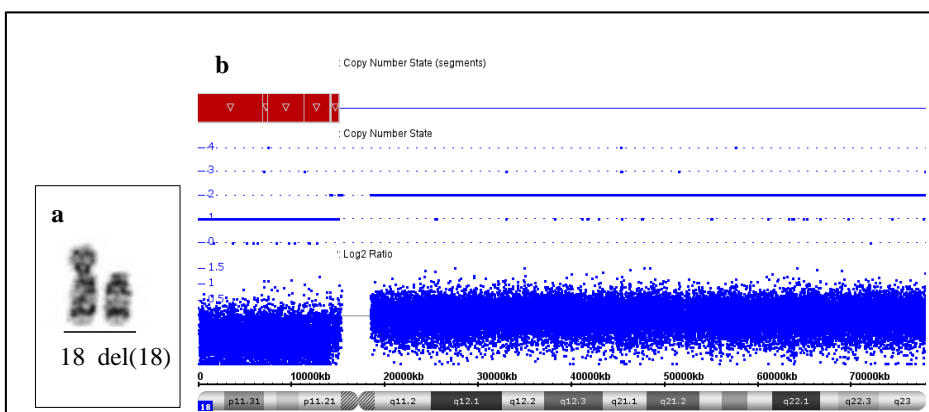


Figura 20: Cariótipo parcial por bandamento G e o *array* genômico parcial do cromossomo 18 do paciente 4. Observam-se o cromossomo 18 normal e o cromossomo 18 com deleção do braço curto em (a) e a deleção de 15 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21.

4.6.1.6 Paciente 5: V.H.H.P.L.

O paciente apresenta uma deleção pura de 8,1 Mb envolvendo as bandas 18pter→p11.23, conforme apresentado na figura 21.

O resultado do estudo citogenético-molecular foi dado como: 46,XY,del(18)(p11.2)dn.arr[hg19]18p11.32p11.23(136,226 - 8,471,547)×1

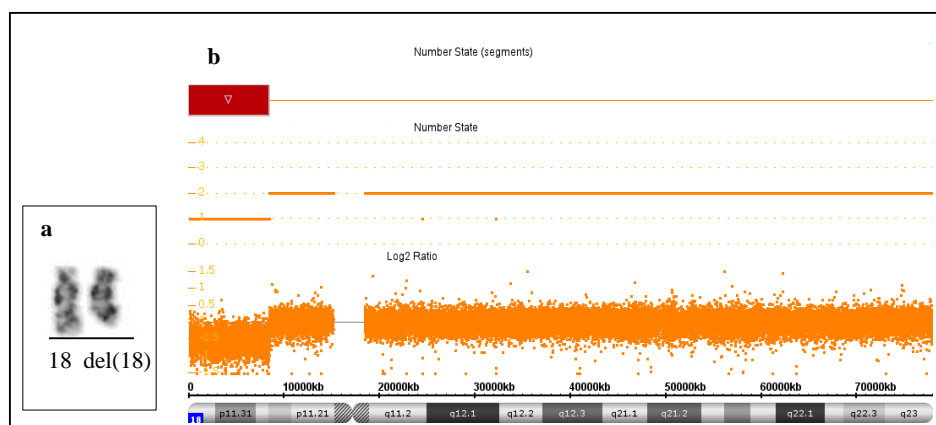


Figura 21: Cariótipo parcial por bandamento G e array genômico parcial do cromossomo 18 do paciente 5. Observam-se o cromossomo 18 normal e o cromossomo 18 com deleção do braço curto em (a) e a deleção de 8,1 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.23 em (b).

4.6.2 Pacientes com anel do cromossomo 18 (grupo II)

4.6.2.1 Paciente 6: T.A.S.

A paciente 6 apresenta r(18) com pontos de quebra nas bandas 18p11.21 e 18q23, composto por deleção de 15,2 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21 e deleção de 1,7 Mb do braço longo do cromossomo 18 desde a banda q23, conforme apresentado na figura 22, a qual mostra também os resultados da FISH.

O resultado do estudo citogenético-molecular da paciente foi dado como: 46,XX,r(18)(18p11.21q23)dn.arr[hg19]18p11.32p11.21(11,542-15,249,167)×1, 18q23(76,330,387-78,015,057)×1.

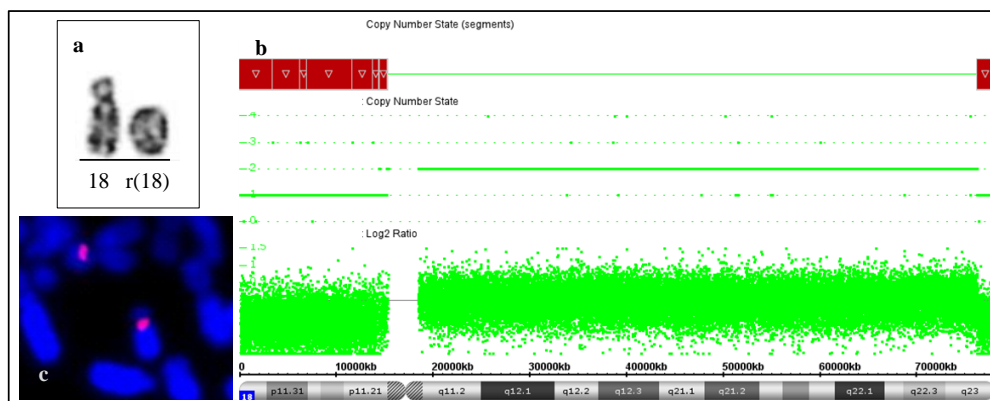


Figura 22: Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e *array* genômico da paciente 6. Observa-se o cromossomo 18 normal, um cromossomo 18 em anel em (a), a deleção de 15,2 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21 a deleção de 1,7 Mb do braço longo do cromossomo 18 na banda q23 em (b) e a FISH para a região centromérica de 18 marcada em vermelho, mostrando um cromossomo 18 normal e um cromossomo 18 em anel monocêntrico em (c).

4.6.2.2 Paciente 7: J.D.A.B.

O paciente 7 apresenta anel do cromossomo 18 com pontos de quebra nas bandas 18p11.32 e 18q22.2, composto pela deleção de 1,3 Mb do braço curto do cromossomo 18 na banda p11.32 e a deleção de 11,1 Mb do braço longo do cromossomo 18 desde a banda q22.2, conforme apresentado na figura 23, a qual mostra também os resultados da FISH.

O resultado do estudo citogenético-molecular do paciente foi dado como: 46,XY,r(18)(p11.32q22.2)dn.arr[hg19]18p11.32(1,542-1,383,478)×1, 18q22.2q23(66,866,885-78,015,057)×1.

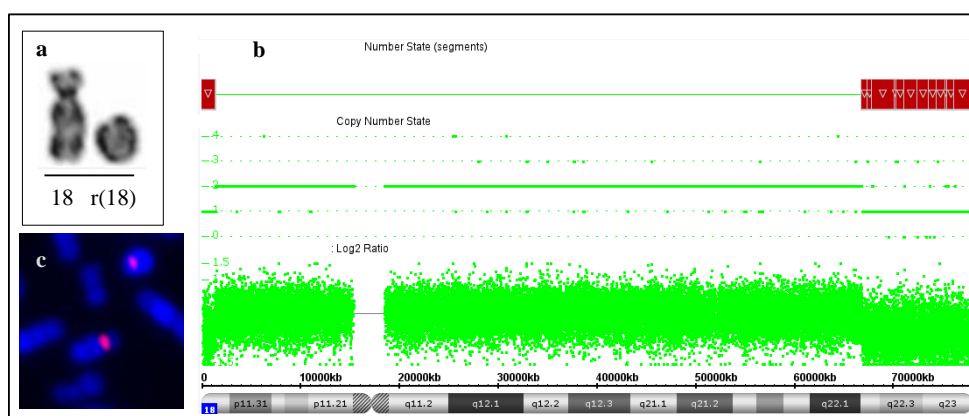


Figura 23: Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e *array* genômico do paciente 7. Observa-se o cromossomo 18 normal e um cromossomo 18 em anel em (a), a deleção de 1,3 Mb do braço curto do cromossomo 18 na banda p11.32 e a deleção de 11,1 Mb do braço longo do cromossomo 18 desde a banda q22.2 em (b) e a FISH para a região centromérica de 18 marcada em vermelho, mostrando um cromossomo 18 normal e um cromossomo 18 em anel monocêntrico em (c).

4.6.3 Pacientes com deleção 18p associada à duplicação ou deleção de outro cromossomo (Grupo III)

4.6.3.1 Paciente 8: D.S.N.

O paciente 8 apresenta uma deleção 18pter→p11.31 e uma duplicação 16q24→qter, decorrente de um derivado da translocação equilibrada t(16;18) presente no genitor. Os resultados das análises citogenéticas e moleculares encontram-se na figura 24.

O *array* do paciente mostrou uma duplicação terminal de 6,5 Mb do braço longo do cromossomo 16 a partir da q23.3 e uma deleção de 5,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31.

O resultado do estudo citogenético-molecular do paciente foi dado como: 46,XY,der(18),t(16;18)(q24;p11.31)pat.arr[hg19]16q23.3q24.3(82,328,651-88,815,024)×3, 18p11.32p11.31(1,543-5,385,430)×1

Os cariótipos por bandamento G dos genitores e da irmã, que são fenotipicamente normais, foram normais, não tendo sido possível detectar a translocação equilibrada. A FISH com a sonda RP11-113J12 para a região 18p 11.31 dos genitores e da irmã revelou a translocação equilibrada entre os cromossomos 16 e 18 no pai e na irmã do paciente enquanto que a FISH com a mesma sonda foi normal na genitora.

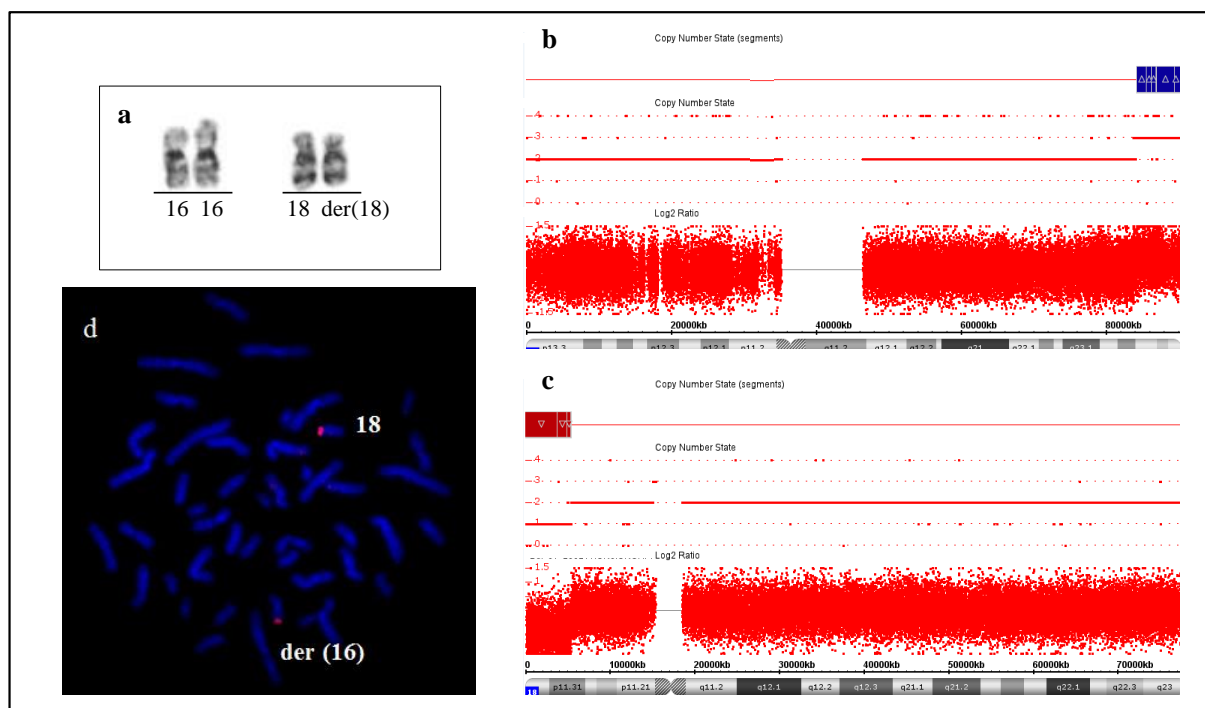


Figura 24: Cariótipos parciais sob bandamento G, por meio de FISH e *array* genômico parcial do paciente 8. Observa-se a deleção do braço curto do cromossomo 18, porém a duplicação no braço longo do cromossomo 16 não é visualizada nesta resolução em (a), *array* genômico mostrando a duplicação a partir da banda 16q23.3 representada pelo retângulo azul em (b), *array* genômico mostrando a deleção até 18p11.31 representada pelo retângulo vermelho em (c) e a FISH com a sonda para a região 18p11.31 mostrando um sinal no cromossomo 18 e outro no cromossomo 16 em (d), confirmando a translocação equilibrada no genitor do paciente.

4.6.3.2. Paciente 9: S.G.F.

O paciente 9 apresenta uma deleção 18pter→p11.31 e uma duplicação 5q34→qter, decorrente de um derivado da translocação equilibrada materna t(5;18) presente na genitora. O cariótipo por bandamento G do paciente revelou material cromossômico adicional no braço curto do cromossomo 18 (Figura 25 a).

O cariótipo por bandamento G do genitor foi normal e o da genitora revelou uma translocação equilibrada entre o braço curto do cromossomo 5 e o braço curto do cromossomo 18 (Figura 25 b).

A FISH com sonda RP11-113J12 de 18p11.31 hibridizou no braço longo do cromossomo 5, confirmando a translocação equilibrada t(5;18) materna. O cariótipo por bandamento G e a FISH confirmaram também a presença da translocação equilibrada t(5;18) realizadas na irmã do paciente. Os resultados das análises citogenéticas e moleculares encontram-se resumidos na Figura 25.

Observam-se a duplicação de 16,7 Mb no braço longo do cromossomo 5 desde a banda q34 (Figura 25 c) e a deleção de 5 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (Figura 25 d).

O resultado do estudo citogenético-molecular do paciente foi dado como: 46,XY,der(18),t(5;18)(q34;p11.31)mat.arr5q34q35.3(163,791,389-180,491,461)×3, 18p11.32p11.31(11,542-5,003,537)×1.

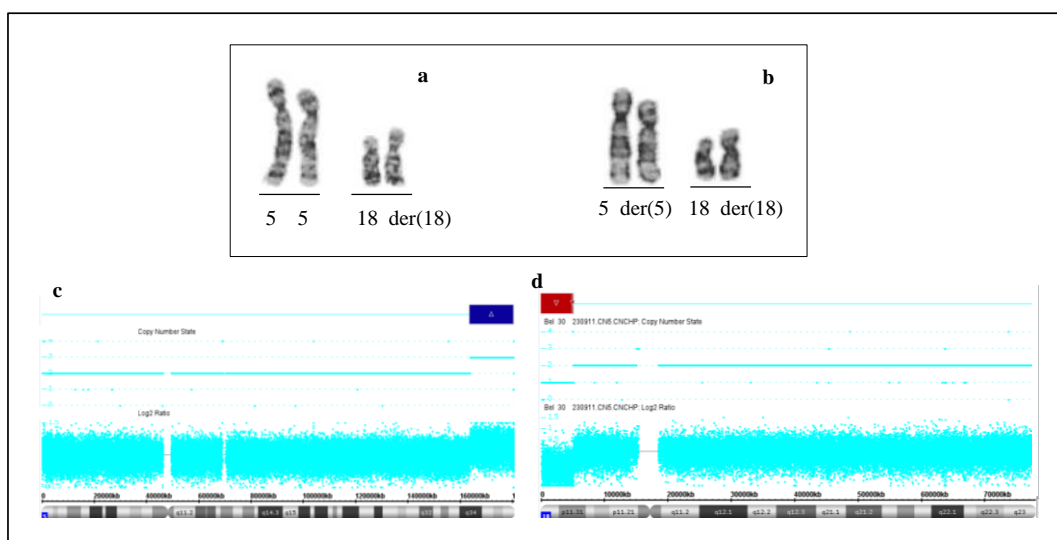


Figura 25: Cariótipos parciais por bandamento G do paciente 9 e de sua mãe e *array* genômico parcial do paciente 9. Observa-se material adicional no braço curto do cromossomo 18 no cariótipo parcial do paciente 9 (a), cariótipo parcial da genitora mostrando a translocação equilibrada entre o braço longo do cromossomo 5 e o braço curto do cromossomo 18 (b), o *array* parcial do paciente 9 revela a duplicação de 16,7 Mb no braço longo do cromossomo 5 desde a banda q34 em (c) e a deleção de 5 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 em (d).

4.6.3.3 Paciente 10: J.M.S.

O paciente 10 apresenta uma deleção 18pter→p11.31 e uma duplicação 9pter→q13.1, decorrente de um derivado da translocação equilibrada materna t(9;18) presente na genitora. O cariótipo por bandamento G do paciente revelou material cromossômico adicional no braço curto do cromossomo 18 (Figura 26 a).

O cariótipo por bandamento G do genitor foi normal e o da genitora revelou uma translocação equilibrada entre o braço curto do cromossomo 9 e o braço curto do cromossomo 18 (Figura 26 b).

A FISH com sondas centroméricas dos cromossomos 9 e 18 no paciente 10 mostrou os cromossomos 9 normais (Figura 26 c) e um cromossomo 18 normal e o outro com o material adicional do cromossomo 9.

Os resultados das análises citogenéticas e moleculares encontram-se resumidos na Figura 22. Observa-se duplicação de 44,5 Mb no braço curto do cromossomo 9 desde a banda p11.2 (Figura 26 e) e a deleção de 6,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (Figura 26 f).

O resultado do estudo citogenético-molecular do paciente foi dado como: 46,XY,der(18)t(9;18)(p13.1;p11.31)mat.arr9p24.3p11.2(203,861-44,765,785)×3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936)×1.

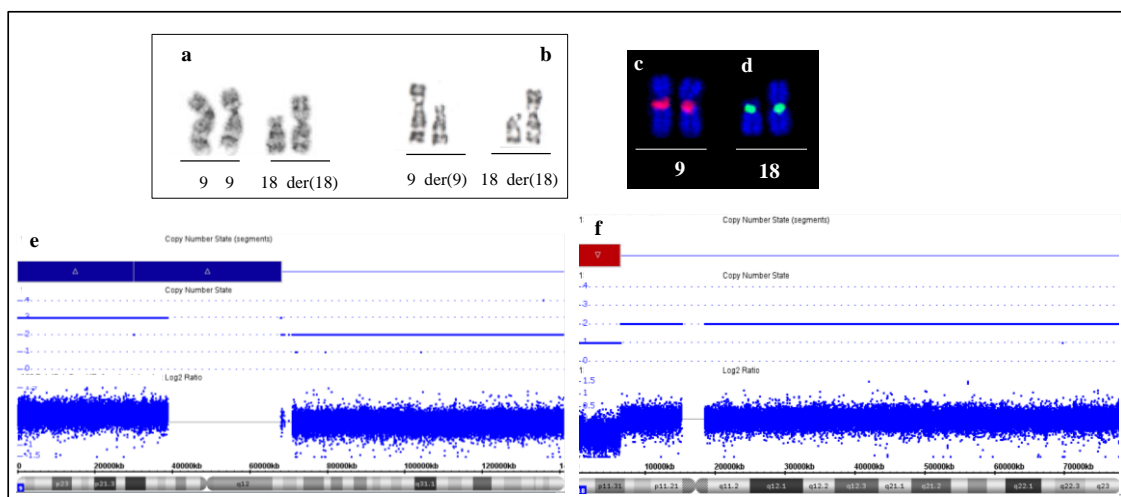


Figura 26: Cariótipos parciais por bandamento G do paciente 10 e de sua mãe, por método de FISH e array genômico do paciente 10. Observam-se os cromossomos 9 normais e material adicional no braço curto do cromossomo 18 correspondendo ao braço curto do cromossomo 9 do paciente 10 (a); cariótipo parcial da genitora mostrando a translocação equilibrada entre os braços curtos dos cromossomos 9 e 18 (b); FISH com sondas centroméricas dos cromossomos 9 e 18 no paciente 10 mostrando os cromossomos 9 normais (c) e um cromossomo 18 normal e o outro com o material adicional do cromossomo 9 (d); Observa-se duplicação de 44,5 Mb do braço curto do cromossomo 9 desde a banda p11.2 (e) e a deleção de 6,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (f).

4.6.3.4 Paciente 11: R.V.S.

A paciente 11 é irmã do paciente 10 e apresenta alterações citogenéticas e moleculares similares. A paciente 10 apresenta uma deleção 18pter→p11.31 e uma duplicação 9pter→q11.2, decorrente de um derivado da translocação equilibrada materna t(9;18) presente

na genitora. O cariótipo por bandamento G da paciente revelou material cromossômico adicional no braço curto do cromossomo 18 (Figura 27 a).

O cariótipo por bandamento G do genitor foi normal e o da genitora revelou uma translocação equilibrada entre o braço curto do cromossomo 9 e o braço curto do cromossomo 18 (Figura 27 b).

A FISH com sondas centroméricas dos cromossomos 9 e 18 na paciente 11 mostraram os cromossomos 9 normais (Figura 27 c) e um cromossomo 18 normal e o outro com o material adicional do cromossomo 9 (Figura 27 d).

Os resultados das análises citogenéticas e moleculares encontram-se resumidos na Figura 24. Observa-se duplicação de 44,5 Mb no braço curto do cromossomo 9 desde a banda p11.2 (Figura 27 e) e a deleção de 6,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (Figura 27 f).

O resultado do estudo citogenético-molecular da paciente foi dado como: 46,XX,der(18)t(9;18)(p13.1;p11.31)mat.arr9p24.3p11.2(203,861-44,765,785)×3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936)×1.

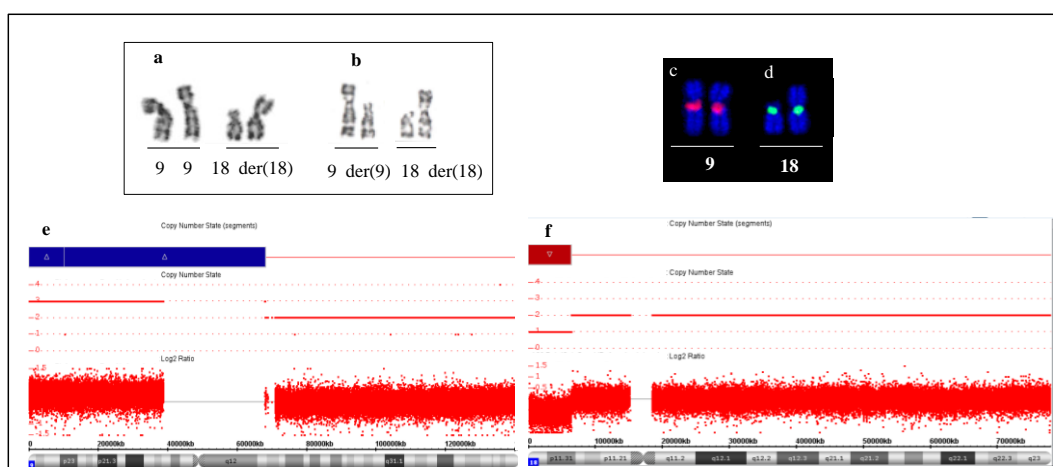


Figura 27: Cariótipos parciais por bandamento G da paciente 11 e de sua mãe, por método de FISH e *array* genômico da paciente 11. Observam-se os cromossomos 9 normais e material adicional no braço curto do cromossomo 18 correspondendo ao braço curto do cromossomo 9 da paciente 11 (a); cariótipo parcial da genitora mostrando a translocação equilibrada entre os braços curtos dos cromossomos 9 e 18 (b); FISH com sondas centroméricas dos cromossomos 9 e 18 na paciente 11 mostrando os cromossomos 9 normais (c), um cromossomo 18 normal e o outro com o material adicional do cromossomo 9 (d); Observa-se duplicação de 44,5 Mb do braço curto do cromossomo 9 desde a banda p11.2 (e) e a deleção de 6,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (f).

A Figura 28 mostra o heredograma simplificado da família dos pacientes 10 (III-3) e 11 (III-4) onde observamos vários portadores da translocação equilibrada entre os braços curtos dos cromossomos 9 e 18, transmitida por três gerações havendo três pacientes que apresentam a duplicação 9p associada à deleção 18p. O indivíduo III-6, embora afetado, segundo o relato dos pais dos pacientes, não participou do nosso estudo.

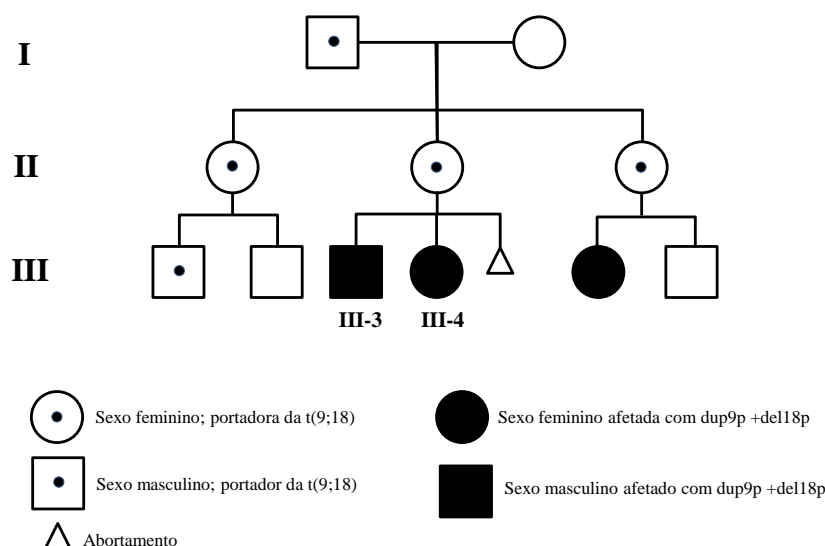


Figura 28: Heredograma simplificado da família dos pacientes 10 (III-3) e 11 (III-4).

4.6.1.5 Paciente 12: P.L.S.

O paciente 12 apresenta uma translocação $t(18;21)$ *de novo* envolvendo as bandas 18p11.21 e 21q11.2 uma vez que o cariótipo dos pais foi normal.

O desequilíbrio cromossômico envolve duas deleções: uma de 14 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.21 (Figura 29 b) e outra de 353 kb no braço longo do cromossomo 21 (Figura 29 c). Nesse caso devemos considerar que o paciente apresenta também a deleção de todo o braço curto do cromossomo 21 em função da $t(18;21)$ com uma constituição cariotípica com 45 cromossomos. Essa deleção não apareceu no *array* porque não há sondas para o braço curto, nem para a região centromérica do 21 (Figura 29 c).

O resultado do estudo citogenético-molecular foi dado como:

45,XY,der(18)t(18;21)(p11;q11),-21dn.arr18p11.32p11.21(136,226-14,140,316)×1,
21q11.2(15,033,710-15,386,607)×1.

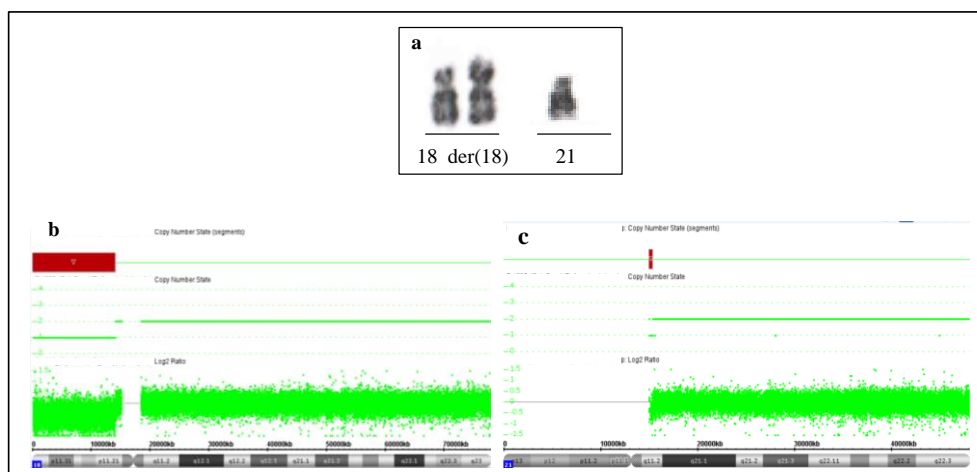


Figura 29: Cariótipo parcial por bandamento G e array genômico parcial do cromossomo 18 e do cromossomo 21 do paciente 12. Observa-se um cromossomo 18 normal e material adicional no braço curto do cromossomo 18 correspondendo ao braço longo do cromossomo 21 e apenas um cromossomo 21 normal em (a), a deleção de 14 Mb do braço curto do cromossomo 18 até banda p11.21 em (b) e a deleção de 353 kb do braço longo do cromossomo 21 na banda q11.2 em (c).

A Tabela 10 resume os resultados dos cariótipos por bandamento G nos pacientes e em seus pais.

A Tabela 11 resume os resultados da avaliação por FISH dos pacientes com anel e translocação evidenciando as sondas de BAC-FISH utilizadas.

A Tabela 12 resume os *arrays* genômicos dos pacientes e destaca o tamanho dos desequilíbrios cromossômicos encontrados.

Tabela 10 - Cariótipo por bandamento G dos pacientes e de seus pais

Paciente	Cariótipo paciente	Cariótipo dos pais
1	46,XX,der(18),t(8;18)(p23;p11.23)pat	46,XY,t(8;18)(p23;p11.23) 46,XX
2	46,XX,del(18)(p11.2)dn	46,XY 46,XX
3	46,XX,del(18)(p11.2)	Pai NR 46,XX
4	46,XY,del(18)(p11.21)dn	46,XY 46,XX
5	46,XY,del(18)(p11.32p11.23)dn	46,XY 46,XX
6	46,XX,r(18)(p11.21q23)	Pai NR Mãe NR
7	46,XY,r(18)(p11.32q23)dn	46,XY 46,XX
8	46,XY,der(18)t(16;18)(q23.3;p11.31)pat	46,XY,t(16;18)(q23.3;p11.31) 46,XX
9	46,XY,der(18)t(5;18)(q34;p11.31)mat	46,XY 46,XY,t(5;18)(q34;p11.31)
10	46,XY,der(18)t(9;18)(p13.1;p11.31)mat	46,XY 46,XX,t(9;18)(p13.1;p11.31)
11	46,XX,der(18)t(9;18)(p13.1;p11.31)mat	46,XY 46,XX,t(9;18)(p13.1;p11.31)
12	45,XY,der(18)t(18;21)(p11;q11),-21dn	46,XY 46,XX

NR: não realizado

Tabela 11 - Resultados da avaliação por FISH. Resumo dos resultados da FISH nos pacientes com anel e translocação e as sondas de BAC-FISH utilizadas

Paciente	Alteração cromossômica no paciente	FISH do pai	FISH da mãe	Sondas
P1	del 18p	NR	NR	-
P6	r(18)	NR	NR	D18Z1
P7	r(18)	NR	NR	D18Z1
P8	dup 16q e del 18p	der(18)t(16;18)	normal	RP11-113J12
P9	dup 5q e del 18p	normal	der(18)t(5;18)	RP11-113J12
P10	dup 9q e del 18p	normal	der(18)t(9;18)	D18Z1 e D9Z1
P11	dup 9p e del 18p	normal	der(18)t(9;18)	D18Z1 e D9Z1

Tabela 12 - Resultado do array dos pacientes. Array genômico dos pacientes com as coordenadas genômicas e resumo dos desequilíbrios cromossômicos encontrados

Paciente	Array	del18p	del18q	del21q	dup16q	dup5q	dup9p
1	arr18p11.32p11.23(11,542-8,156,545)×1	8,1 Mb	-	-	-	-	-
2	arr18p11.32p11.21(11,542-12,335,159)×1	12,3 Mb	-	-	-	-	-
3	arr18p11.32p11.21(444,686-14,852,452)×1	14,4 Mb	-	-	-	-	-
4	arr18p11.32p11.21(11,542-15,092,474)×1	15 Mb	-	-	-	-	-
5	arr18p11.32p11.23(136,226-8,471,547)×1	8,1 Mb	-	-	-	-	-
6	arr18p11.32p11.21(11,542-15,249,167)×1, 18q23(76,330,387-78,015,057)×1	15,2 Mb	1,7 Mb	-	-	-	-
7	arr18p11.32(11,542-1,383,478)×1, 18q22.2q23(66,866,885-78,015,057)×1	1,3 Mb	11,1 Mb	-	-	-	-
8	arr16q23.3q24.3(82,328,651-88,815,024)×3, 18p11.32p11.31(1,543-5,385,430)×1	5,4 Mb	-	-	6,5 Mb	-	-
9	arr18p11.32p11.31(11,542-5,003,537)×1, 5q34q35.3(163,791,389-180,491,461)×3	5 Mb	-	-	-	16,7 Mb	-
10	arr9p24.3p11.2(203,861- 44,765,785)×3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936)×1	6,4 Mb	-	-	-	-	44,5 Mb
11	arr9p24.3p11.2(203,861- 44,765,785)×3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936)×1	6,4 Mb	-	-	-	-	44,5 Mb
12	arr18p11.32p11.21(136,226-14,140,316)×1, 21q11.2(15,033,710-15,386,607)×1	14 Mb	-	353 kb	-	-	-

A tabela 13 resume os pontos de quebra no braço curto do cromossomo 18 encontrados nos pacientes do presente estudo.

Tabela 13 - Pontos de quebra no braço curto do cromossomo 18 encontrados nos pacientes da amostra

Pontos de quebra	18p11.21	18p11.23	18p11.31	18p11.32
Pacientes	2, 3, 4, 6 e 12	1 e 5	8, 9, 10 e 11	7

4.7 Avaliação Comparativa dos dados clínicos e citogenômicos

Do ponto de vista gestáltico facial, notamos que alguns pacientes do grupo I se pareciam muito com pacientes dos outros grupos como, por exemplo, a paciente 6 do grupo II e o paciente 12 do grupo III (Figura 30), todos com o ponto de quebra em 18p11.21.

A paciente 6 apresentou r(18) com pontos de quebra em 18p11.21 (deleção de 15,2 Mb) e em 18q23 (pequena deleção de 1,7 Mb).

O paciente 12, apresentou deleção 18p e 21q em decorrência da translocação t(18;21) com ponto de quebra em 18p11.21 (deleção de 14 Mb) e em 21q11.2 (deleção de 353 kb da região eucromática do cromossomo 21), em uma constituição cromossômica com 45 cromossomos com a falta de um cromossomo 21 completo. As fotos desses pacientes foram agrupadas na figura 30.



Figura 30: Vista facial frontal dos pacientes com pontos de quebra em 18p11.21. Observamos as semelhanças faciais entre os pacientes que apresentam deleção 18p pontos de quebra próximos à região centromérica. Pacientes (P2, P3 e P4) com deleção 18p pura; paciente 6 (P6) com r(18) e paciente 12 (P12) com t(18;21).

A mesma comparação gestáltica das características faciais pode ser observada entre os pacientes 1 e 5 do grupo I que apresentaram deleção de 8,1 Mb de 18pter a 18p11.23 (Figura 31).



Figura 31: Vista facial frontal dos pacientes com pontos de quebra em 18p11.23. Observa-se um aspecto facial semelhante e suave entre os pacientes P1 e P5, ambos com deleção de 18pter a 18p11.23.

Nos pacientes do grupo III, o fenótipo facial foi influenciado não só pela deleção 18p, mas também pela duplicação do outro cromossomo envolvido no desequilíbrio e, na tabela 14, destacamos os genes mais importantes encontrados nos desequilíbrios genômicos dos outros cromossomos envolvidos.

Tabelas 14– Desequilíbrios genômicos dos pacientes 8, 9, 10, 11 e 12 associados à deleção 18p, tamanho da alteração cromossômica, alguns genes da região e fenótipos relacionados a esses genes

Paciente	Desequilíbrios genômicos	Tamanho	Fenótipos relacionados	Genes
8	16q23.3q24.3(82,328,651-88,815,024)×3	6,5 Mb	Imunodeficiência 32A-AD e AR	<i>IFR8</i>
			Displasia alvéolo-capilar com desalinhamento das veias pulmonares	<i>FOXF1</i>
			Doença granulomatosa crônica AR	<i>CYBA</i>
			Deficiência intelectual AR-45	<i>FBXO31</i>
			Doença inflamatória (regulação) / diferenciação celular dos linfócitos Th 17	<i>IL17C</i>
9	5q34q35.3(163,791,389-180,491,461)×3	16,7 Mb	Leucodistrofia hipomielinizante 9-AR	<i>RARS</i>
			Cranioestenose 2-tipo Boston	<i>MSX2</i>
			Síndrome de Sotos 1	<i>NSD1</i>
10 e 11	9p24.3p11.2(203,861- 44,765,785)×3	44,5 Mb	Desenvolvimento gonadal	<i>DMRT1</i> <i>DMRT2</i>
			Desenvolvimento do SNC e processos de aprendizado, memória e alteração de humor	<i>PSIPI</i> <i>PAX5</i> <i>SIGMARI</i> <i>CNTNAP3</i>
12	21q11.2(15,033,710-15,386,607)×1	353 kb	Não há fenótipo reconhecido para os genes da região	<i>POTED</i> <i>TPTE</i>

Todos os pacientes do presente estudo apresentaram a perda de um segmento cromossômico em comum localizado em 18p11.32-18p11.32 (coordenadas: 1-1,385,430).

A figura 32 mostra a região compartilhada com os fenótipos relacionados com a região deletada (Figura 32).



Figura 32: Região deletada compartilhada por todos os pacientes da amostra (chr18: 1-1,385,430).

Idiograma do cromossomo 18 onde o retângulo vermelho evidencia a região da deleção no braço curto do cromossomo (a). As barras coloridas representam as alterações fenotípicas e algumas doenças com os genes ressaltados ao lado das mesmas (b) AA1: Alopecia areata-tipo 1; DFN46: Surdez autossômica recessiva não síndrômica-46; DSAP: Poroqueratose actínica superficial disseminada. Modificado de <http://pediatrics.uthscsa.edu/centers/chromosome18/dosage.asp>.

A comparação representativa entre todos os segmentos cromossômicos envolvidos estão resumidos na Figura 33, onde podemos visualizar esquematicamente todos os pacientes separados nos respectivos grupos. As deleções são representadas por barras vermelhas e as duplicações por barras azuis. Na parte superior da figura está a representação gráfica com bandas de todo o cromossomo 18 e os genes mais importantes em verde.

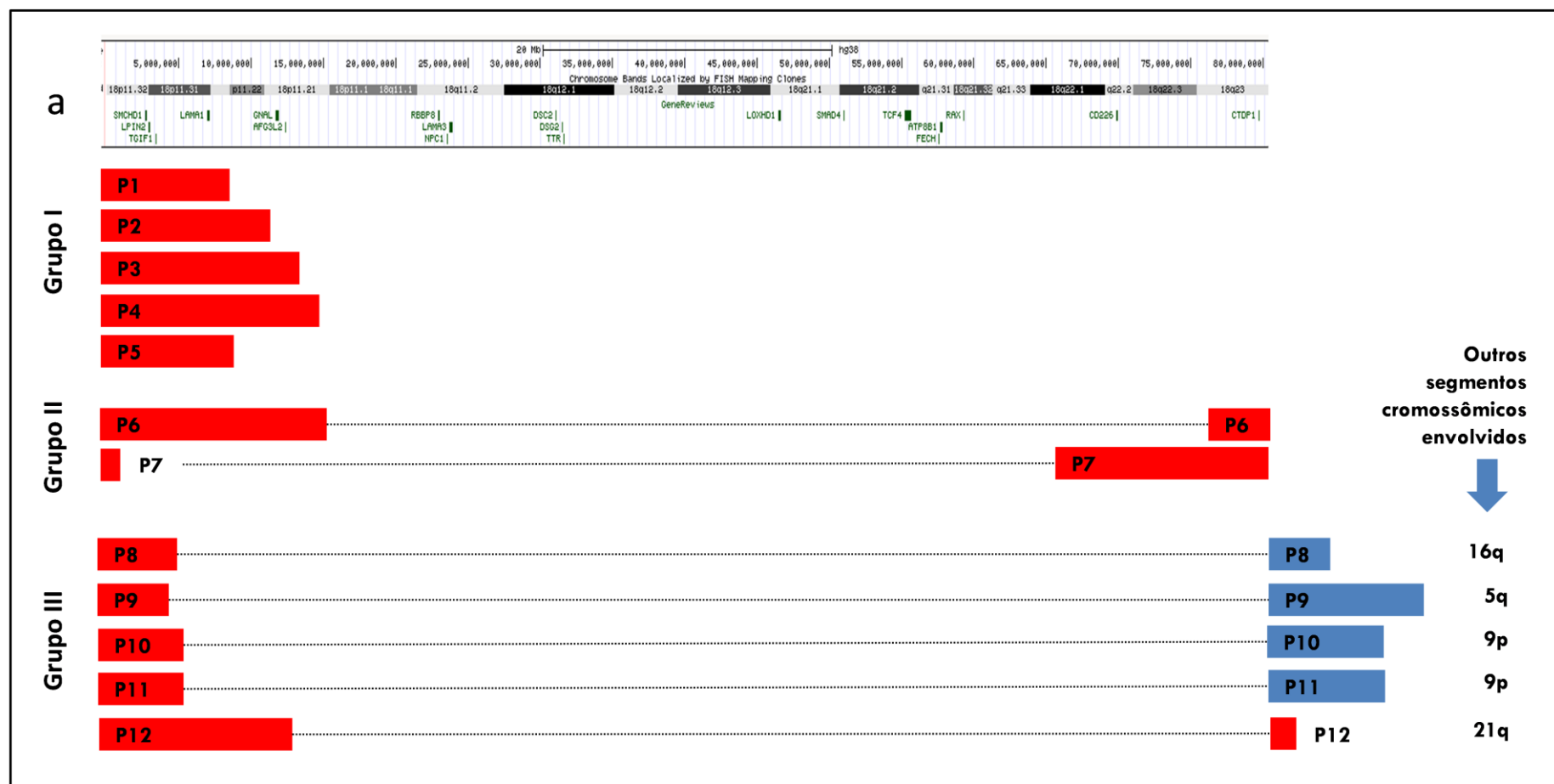


Figura 33: Gráfico comparativo dos segmentos cromossômicos alterados dos pacientes da amostra. Representação gráfica das bandas de todo o cromossomo 18 em escala com a da localização das bases (coordenadas: 1-80.000.000) e alguns genes da região em verde (a). Abaixo, as deleções estão representadas por barras vermelhas e as duplicações por barras azuis dos respectivos pacientes anotados em cada barra (de P1 a P12) e à esquerda os grupos correspondentes (Grupos I, II e III), sendo que o tamanho das barras corresponde à região do cromossomo 18 acima representado. À direita da figura estão descritos os segmentos de outros cromossomos concomitantemente envolvidos.

Do mesmo modo que comparamos do ponto de vista gestáltico os pacientes do grupo I com a paciente 6 do grupo II e o paciente 12 do grupo III, em função do segmento cromossômico deletado com ponto de quebra em 18p11.21, comparamos aqui o desempenho intelectual desses pacientes. Além disso, incluímos também nesta comparação a avaliação neuropsicológica do paciente 5, que apresenta a deleção menor com ponto de quebra em 18p11.23, e que apresenta fenótipo facial mais suave e desempenho intelectual melhor que os pacientes com ponto de quebra em 18p11.21. Os dados foram resumidos na tabela 15 e na figura 34.

Tabela 15: Avaliação neuropsicológica dos pacientes que apresentaram deleção até as bandas 18p11.21 e 18p11.23

Paciente	2	3	4	5	6	12
Idade (anos)	11	23	25	24	16	20
Tamanho da deleção em 18p	12,3 Mb	14,4 Mb	15 Mb	8,1 Mb	15,2 Mb	14 Mb
Pontos de quebra	18p11.21	18p11.21	18p11.21	18p11.23	18p11.21 18q23	18p11.21 21q11.2
Desempenho intelectual						
QI	59	63	77	83	50	68
QI Execução	66	67	79	81	51	66
QI Verbal	60	64	77	86	53	71
Habilidades adaptativas						
Comunicação	65	21	51	25	57	43
Atividades de vida diária	63	46	49	81	48	43
Socialização	80	40	62	77	58	51
Habilidades Motoras	67	74	72	70	94	70

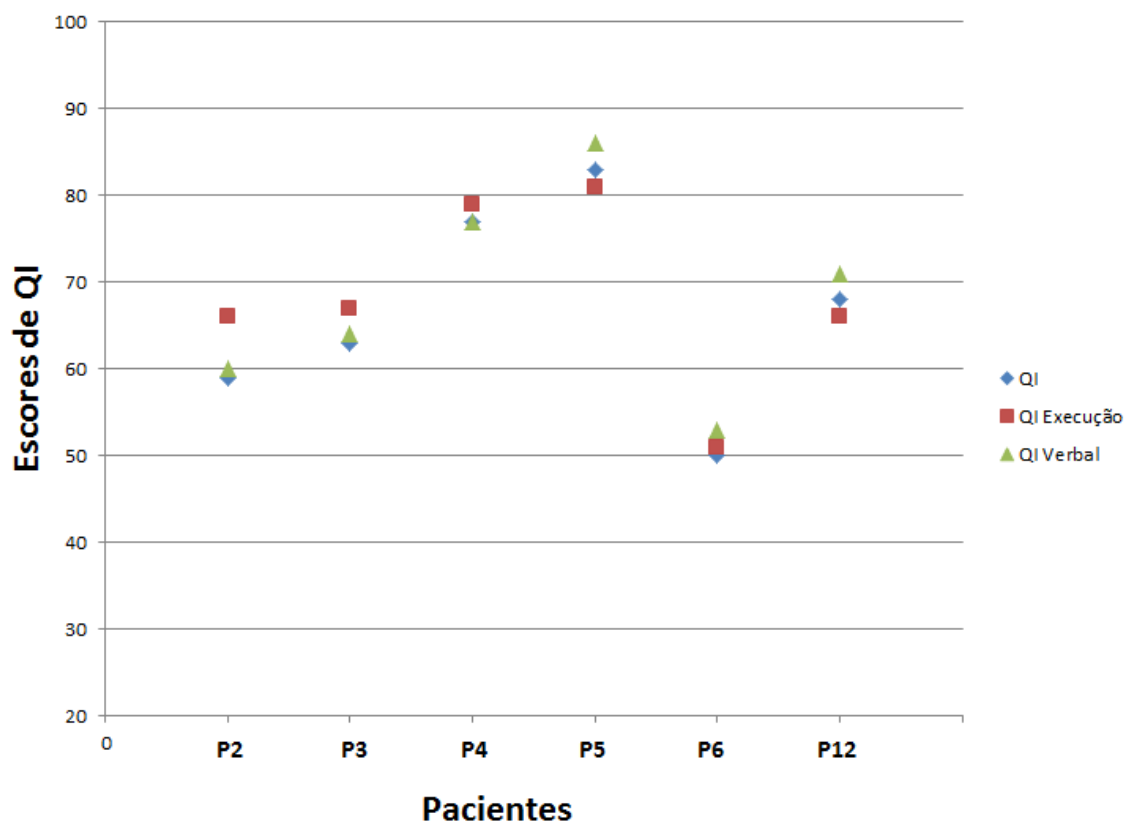


Figura 34: Comparação dos índices de quociente de inteligência dos pacientes que apresentaram deleção com ponto de quebra em 18p11.21 e 18p11.23. Quociente de inteligência verbal (QIV), de execução (QIE) e total (QIT) dos pacientes 2, 3, 4, 6, e 12 com ponto de quebra em 18p11.21 e do paciente 5 com ponto de quebra em 18p11.23. No eixo y do gráfico o limite superior é o QI médio (100).

O resumo com todos os resultados foram agrupados em dois quadros: o quadro 2 (Anexo 4), com os resultados dos pacientes do grupo I e o quadro 3 (Anexo 5), com os resultados dos pacientes dos grupos II e III.

4.8 Recomendações sugeridas para a avaliação e seguimento clínico de pacientes com deleção 18p

A partir da revisão da literatura e dos resultados encontrados neste estudo, sugerimos as seguintes recomendações para o seguimento clínico dos pacientes com deleção 18p.

4.8.1 Diagnóstico clínico

Realizar avaliação genético-clínica utilizando o protocolo mostrado no Anexo 3, com atenção às dismorfias apresentadas na Tabela 3 do presente estudo.

Os principais achados clínicos que podem indicar a suspeita diagnóstica para a deleção 18p são: hipotonia, deficiência intelectual, retardo do crescimento pós-natal, baixa estatura proporcionada, fâscies arredondada, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, macrostomia, filtro curto e proeminente, anomalias dentárias, orelhas grandes e protrusas, pescoço curto e alargado, escoliose e/ou cifose, genitália anormal e cardiopatia.

As dismorfias nem sempre são detectadas ao nascimento ficando mais evidentes após os três anos de idade. A maioria dos pacientes é encaminhada ao serviço de genética por deficiência de crescimento, dismorfias faciais e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

4.8.2 Diagnóstico citogenético

Realizar cariótipo por bandeamento G dos pacientes, pois permite a identificação da deleção 18p na maioria dos casos.

O *array* deve ser solicitado quando o quadro clínico for sugestivo de anomalia cromossômica e o cariótipo não for resolutivo na identificação da mesma. Além de identificar o tamanho dos desequilíbrios e os cromossomos envolvidos, o *array* permite a melhor resolução dos pontos de quebra.

O exame citogenético por bandamento G dos pais é essencial em todos os casos para a investigação de rearranjos equilibrados, pois modifica o cálculo de risco para o aconselhamento genético e o risco de repetição para a prole no caso da presença de rearranjo equilibrado nos pais. Na presença de translocação equilibrada nos pais, o estudo cromossômico dos irmãos dos pacientes é recomendado.

Nos casos em que o cariótipo por bandamento G dos pais for normal, mas a história familiar sugerir suspeita de alteração cromossômica por rearranjo equilibrado, como por exemplo, abortamento de repetição na prole ou outros casos de alteração cromossômica na família, recomenda-se a realização da FISH para os segmentos cromossômicos envolvidos, para descartar a presença de rearranjo equilibrado em um dos pais.

4.8.3 Achados chave para o acompanhamento

4.8.3.1 Detecção das anomalias associadas

Recomenda-se: avaliação cardiológica com ecocardiograma (logo ao nascimento ou na suspeita clínica); ressonância magnética de crânio (na suspeita de alteração do espectro da holoprosencefalia e alterações da substância branca); ressonância magnética de hipófise (na suspeita de espectro da holoprosencefalia e deficiência do hormônio de crescimento); estudo radiológico do esqueleto e ultrassonografia do abdômen; rins e vias urinárias; para o reconhecimento das anomalias congênitas associadas mais prevalentes e encaminhamento aos especialistas relacionados às anomalias encontradas.

4.8.3.2 Alterações endócrinas

Ao diagnóstico, recomenda-se a avaliação com endocrinologista, principalmente por risco aumentado para hipotireoidismo e deficiência de hormônio do crescimento. Além disso, há risco aumentado para diabetes e hipercolesterolemia. O controle anual de hormônios tireoidianos, glicemia e do colesterol e suas frações é recomendado, sendo que o controle para a deficiência do hormônio do crescimento deve ser repetido na suspeita clínica.

4.8.3.2 Alterações imunológicas

Ao diagnóstico, recomenda-se a avaliação com imunologista, que deve ser ampla em função da variabilidade das alterações descritas (avaliações das imunoglobulinas séricas, da resposta a antígenos polissacarídeos e do sistema complemento). Recomenda-se o controle cada cinco anos até a adolescência e novamente na idade adulta no caso de pacientes com infecções de repetição.

4.8.3.3 Alterações auditivas e oftalmológicas

Recomenda-se avaliação auditiva (para identificar presença de deficiência auditiva) e avaliação oftalmológica (para identificar presença de estrabismo, catarata e defeitos de refração) anualmente.

4.8.3.4 Alterações ortopédicas

Recomenda-se a investigação de alterações esqueléticas, sendo as mais frequentes, pé torto congênito, pectus excavatum e cifo-escoliose (após a adolescência), através de exame clínico e radiografias do esqueleto total, uma vez que outras alterações também podem estar presentes. Caso as alterações acarretem problemas clínicos, encaminhar ao ortopedista.

4.8.3.5 Seguimento neurológico

Recomenda-se avaliação com neurologista, pelo risco aumentado de alterações neurológicas (malformações do SNC, convulsões) e pelo risco de desenvolvimento de distonia e ataxia.

4.8.3.6 Alterações neuropsicológicas

Recomenda-se a realização de avaliação neuropsicológica por psicólogo especialista em neuropsicologia e treinado na abordagem de pessoas com deficiência intelectual. O processo deve envolver escalas de desempenho intelectual global apropriadas à idade do paciente, bem como inventários para avaliação do comportamento adaptativo e de aspectos comportamentais. Considerando os achados relativos ao desenvolvimento do comportamento adaptativo, é importante que familiares, terapeutas e educadores sejam orientados a estimular precocemente habilidades associadas aos domínios das atividades de vida diária (autonomia em autocuidados e alimentação) e da comunicação (participação no grupo social, expressão verbal na interação). Além disso, sugerimos avaliação para identificação de sinais do espectro autista. Por fim, a obtenção de informações relativas ao nível socioeconómico e das condições ambientais familiares, bem como dos recursos da comunidade, é fundamental para melhor adequação das orientações terapêuticas e pedagógicas.

No quadro 1 resumimos as recomendações em relação ao momento do diagnóstico e idade dos pacientes com deleção 18p.

Quadro - 1 Resumo das recomendações para o seguimento de pacientes com deleção 18p

	Ao diagnóstico	Anual	Entre 6 e 8 anos	Adolescência	Adultos
Avaliação cardiológica	Descartar cardiopatia congênita (realizar ECG e Ecocardiografia)	Seguimento cardiológico SN	Seguimento cardiológico SN	Cardiologista Ecocardiografia e ECG	Revisão cardiológica
Avaliação endocrinológica	Dosagem de T4 livre/TSH, anticorpos antitireoidianos, avaliação para deficiência de hormônio de crescimento (HC), glicemia, colesterol e frações	TSH/T4 livre Glicemia Colesterol e frações	TSH/T4 livre, avaliação para deficiência de HC, glicemia, colesterol e frações	TSH/T4 livre Glicemia Colesterol e frações	TSH/T4 livre Glicemia Colesterol e frações
Avaliação Renal	Ultrassonografia renal Urina I Urocultura no caso de anomalias urinárias estruturais	Urina 1 e urocultura	Ultrassonografia renal Urocultura Urina 1	Ultrassonografia renal Urocultura Urina 1	Ultrassonografia renal Urocultura Urina 1
Audição e orelhas	Avaliação ORL, audiometria e BERA Identificar atraso de linguagem	Checar otite média e deficiências auditivas	Distúrbio de linguagem	Checar otite média e deficiências auditivas	Checar deficiência auditiva
Visão	Avaliação oftalmológica para investigar catarata congênita	Avaliação oftalmológica Estrabismo e defeitos de refração	Avaliação oftalmológica	Avaliação oftalmológica	Avaliação oftalmológica
Odontológico		Avaliação odontológica (anomalias dentárias e cáries)	Avaliação ortodôntica (maloclusão)	Avaliação odontológica	Avaliação odontológica
Esqueleto	Avaliar alterações ortopédicas (pé torto congênito e escoliose)	Avaliação ortopédica	Avaliação ortopédica	Avaliação ortopédica (escoliose)	Avaliação ortopédica (escoliose)
Avaliação imunológica	Dosagem de imunoglobulinas séricas, avaliação da resposta a antígenos polissacarídeos e do sistema complemento		Reavaliação imunológica	Reavaliação imunológica	Reavaliação imunológica
Avaliação neurológica	Realizar ressonâncias magnéticas de crânio e hipófise, na suspeita de alteração do espectro HPE, alteração de substância branca e convulsões		Avaliação neurológica	Avaliação e seguimento neurológico (convulsão, distonia e ataxia)	Avaliação e seguimento neurológico (convulsão, distonia e ataxia)
Avaliação neuropsicológica	Avaliação neuropsicológica com: desempenho intelectual global das escalas adequadas para a idade, comportamento adaptativo, investigação comportamental e do espectro autista		Reavaliar o desempenho escolar e das habilidades adaptativas	Orientação vocacional	Orientação vocacional

BERA: Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico; ECG: eletrocardiograma; ORL: otorrinolaringológica; SN: se necessário;

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou 12 pacientes com deleção 18p do ponto de vista clínico e citogenômico, caracterizados inicialmente por bandamento G. Os pacientes foram classificados em três grupos de acordo com o tipo de alteração cromossômica observada em 18p, para melhor caracterizar a correlação genótipo-fenótipo. O primeiro grupo (grupo I) foi composto por cinco pacientes com deleção 18p pura, sem envolvimento de outro segmento cromossômico. O segundo grupo (grupo II) foi composto por dois pacientes com r(18) que apresentam deleções 18p e 18q associadas. O terceiro grupo (grupo III) foi composto por cinco pacientes com deleção 18p envolvendo uma translocação com outro segmento cromossômico.

5.1 Caracterização citogenética das deleções 18p

A presente amostra de 12 pacientes apresentou cinco pacientes com ponto de quebra em 18p11.21, dois em 18p11.23, quatro em 18p11.31 e um em 18p11.32 (Tabela 13).

Nos pacientes com deleção 18p pura (grupo I), encontramos os pontos de quebra em 18p11.21 e 18p11.23 (Tabela 3), sendo que nenhum apresentou o ponto de quebra na região 18p11.1, descrito em 42-50% dos casos da literatura (Schinzel, 2001; Schaub et al., 2002; Hasi-Zogaj et al., 2015).

Nos pacientes com r(18) (grupo II), os pontos de quebra observados foram 18p11.21 e 18p11.32 (Tabela 4), sendo que nenhum apresentou duplicação justa-proximal associada às regiões de ponto de quebra, como já descrito em alguns relatos da literatura (Ballif et al., 2003).

Em ambos os pacientes do presente trabalho com r(18), foi possível determinar o ponto de quebra nos anéis cromossômicos (Spreiz et al, 2013-Apêndice 1), mas não foi realizado o estudo de mosaicismo, origem parental ou instabilidade cromossômica que, no caso dos anéis cromossômicos, podem influenciar o fenótipo dos pacientes (Sodré et al., 2010-Apêndice 8; Guilherme et al., 2011-Apêndice 2; Carter et al., 2015).

No grupo III, quatro pacientes apresentaram o ponto de quebra em 18p11.31 e um paciente em 18p11.21 (Tabela 5). Nesse grupo os achados são semelhantes aos casos descritos na literatura, pois se observam pontos de quebra variados no braço curto do cromossomo 18 quando há a associação de outro cromossomo envolvido no desequilíbrio (Carter et al., 2015).

Em relação à origem da alteração cromossômica da amostra, observamos que:

- 1- Grupo I: Dos cinco pacientes com deleção pura, quatro (pacientes 2, 3, 4 e 5) apresentaram deleção 18p *de novo* (80%) e um (paciente 1) por transmissão parental devido a uma translocação equilibrada paterna (20%).
- 2- Grupo II: Nos dois pacientes (pacientes 6 e 7) com r(18), a alteração era *de novo* (100%).
- 3- Grupo III: Dentre os cinco pacientes com deleção 18p associada a translocações envolvendo outro cromossomo, quatro (pacientes 8, 9, 10 e 11) apresentaram cromossomos derivados de translocações equilibradas presentes nos pais (80%) e um (paciente 12) apresentou translocação *de novo* (20%).

No total, sete pacientes apresentaram deleção 18p *de novo* (58%) e em cinco pacientes a deleção 18p foi herdada (42%). Excluindo-se os pacientes com cromossomo em anel, em cinco dos 10 pacientes (50%), a deleção era *de novo* (pacientes 2, 3, 4, 5 e 12).

A taxa de deleções *de novo* em nossa amostra foi menor do que a da literatura relatada como sendo de aproximadamente 66% (Schinzel, 2001; Turleau, 2008), ou mais recentemente, um estudo com a maior amostra já descrita na literatura, de aproximadamente 89% (Hasi-Zogaj et al., 2015).

Verificamos que, excluindo-se os casos de cromossomo em anel, cinco dos 10 pacientes (50%) apresentaram a deleção isolada ou uma translocação envolvendo um acrocêntrico resultando em deleção “pura” (pacientes 1 a 5), taxa menor do que a observada por Hasi-Zogaj et al. (2015), em 91 de 98 (93%) pacientes por eles estudados.

No presente estudo, não definimos a origem parental das deleções 18p *de novo*, mas a revisão da literatura relata que a origem parental das deleções 18p *de novo* parece ser igualmente materna ou paterna (Schaub et al., 2002; Wester et al., 2006; Turleau, 2008; Hasi-Zogaj et al., 2015).

Comprovamos a transmissão parental da amostra pela presença da translocação parental equilibrada em cinco pacientes, sendo três por herança materna (pacientes 9, 10 e 11) e dois por herança paterna (pacientes 1 e 8). Há relatos de transmissão familiar da deleção 18p na literatura, sendo a maioria por herança materna (Uchida et al. 1995; Vegaleti et al., 1996; Tonk e Krishna, 1997; Rigola et al., 2001; Tsukahara et al., 2001) e dois casos de transmissão paterna (Zamani et al., 2014; Hasi-Zogaj et al., 2015). A transmissão por herança paterna foi descrita em uma família na qual havia uma inversão pericêntrica do cromossomo 18

[inv(18)(p11.2q21)] e dois recombinantes com uma duplicação de 18q21→qter e uma deleção 18p11.2→pter, transmitida por quatro gerações (Zamani et al., 2014).

O presente estudo revelou duas famílias com transmissão familiar paterna, sendo esse um achado pouco usual.

Como mostrado na figura 32, todos os pacientes do presente estudo apresentaram a perda de um segmento cromossômico em comum localizado em 18p11.32-18p11.32 (coordenadas: 1-1,385,430) que contém 20 genes (*LOC260334; IL9RP4; ROCK1P1; USP14; THOC1; COLEC12; CETN1; CLUL1; TYMSOS; TYMS; ENOSF1; YES1; BOLA2P1; LOC441806; ADCYAP1; LOC388456; COX6CP3; LINC00470* e *LOC100129774*), sendo que oito deles estão relacionados a doenças do OMIM (*USP14, THOC1, COLEC12, CETN1, TYMS, ENOSF1, YES1* e *ADCYAP1*). Dois desses genes (*THOC1* e o *CETN1*) serão discutidos mais adiante e dentre os restantes destacamos o gene *ADCYAP1* (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-PACAP*), relacionado com o desenvolvimento cerebral em mamíferos e que poderia contribuir para o fenótipo, principalmente em relação às alterações neurológicas.

5.2 Caracterização clínica dos pacientes com deleção 18p: Tabulação e Análise dos dados

No presente estudo, os pacientes foram avaliados através de protocolo clínico e citogenômico, associado às avaliações neuropsicológicas e imunológicas. Entretanto, em função da grande quantidade de exames laboratoriais, de imagens e consultas solicitadas, alguns dos pacientes não compareceram a todas as avaliações e não realizaram todos os exames solicitados.

Realizamos também a revisão do prontuário eletrônico dos pacientes que proporcionou a coleta de dados não informados pelos pais, e de avaliações e exames realizados em outros ambulatorios do complexo hospitalar do Hospital São Paulo, na tentativa de melhor complementar os dados para o protocolo clínico.

O protocolo clínico completo de todos os pacientes proporcionou a verificação comparativa do fenótipo de cada grupo. Além disso, permitiu que realizássemos recomendações para o acompanhamento dos pacientes com deleção 18p em função dos achados mais prevalentes dos pacientes de cada grupo.

Dos 12 pacientes avaliados, cinco eram do sexo feminino e sete do sexo masculino. O peso médio ao nascimento foi de 2.253 g (-1SD), o comprimento médio ao nascimento foi de

46 cm (-1SD) e apenas três pacientes informaram o perímetro cefálico ao nascimento, sendo a média de 31,6 cm (-2SD).

No grupo I observamos peso médio ao nascimento de 2.904 g (-1SD), comprimento médio ao nascimento de 48 cm (-1SD), sendo estes valores semelhantes aos da média da literatura para pacientes com deleção 18p pura (Sebold et al., 2015).

No grupo II a avaliação adequada destes parâmetros foi comprometida, já que não obtivemos os dados de uma paciente que foi adotada.

No grupo III observamos peso médio ao nascimento de 2.911 g (-1SD), comprimento médio ao nascimento de 46,5 cm (-1SD). Nesse grupo a comparação com a literatura foi realizada separadamente para cada associação entre a deleção 18p e a outra alteração cromossômica associada e encontramos correlação semelhante para as alterações cromossômicas descritas.

A literatura relata que em torno de 70% dos indivíduos com deleção 18p apresentam complicações neonatais. No presente estudo, cinco (41,7%) dos doze pacientes apresentaram complicações neonatais que variaram de circular de cordão (2/11), baixo peso ao nascimento (5/11), desconforto respiratório precoce (3/12), hipotonia relatada no berçário (2/12), dificuldade para se alimentar (3/12), internação longa no berçário (4/12), anomalia urogenital (4/12), cranioestenose (1/12), sinais de anóxia perinatal comprovada por RMC (4/5) e cardiopatia detectada no berçário (1/12).

Neste trabalho, oito pacientes apresentaram baixa estatura pós-natal e apenas quatro apresentaram estatura normal. Os pacientes com estatura normal eram todos do grupo I (pacientes 1, 2, 4 e 5). A paciente 1 apresentava aos três anos de idade estatura entre os percentis 15 a 50, mas abandonou o seguimento e não pudemos reavaliá-la do ponto de vista longitudinal.

O paciente 4 apresentou hipotireoidismo e hipófise ectópica com deficiência de hormônio do crescimento detectados aos 5 anos de vida, quando apresentava estatura muito abaixo do percentil 3. Após tratamento com reposição de hormônio de crescimento e correção do hipotireoidismo, o paciente alcançou, aos 18 anos de vida, estatura entre os percentis 3 e 10. O paciente 4, além da baixa estatura antes do tratamento com hormônio de crescimento, também apresentou convulsões durante a infância.

O paciente 5 apresentou estatura final entre os percentis 3 e 10, mesmo com pais apresentando estatura no percentil 75, acima da média da população e sem apresentar

alterações endocrinológicas associadas, sugerindo que a deleção 18p tenha influenciado a estatura final neste paciente menor que a esperada para o seu padrão familiar.

O restante dos pacientes da amostra apresentou estatura muito abaixo do percentil 3.

A baixa estatura é frequentemente descrita na literatura em indivíduos com deleção 18p e pode estar relacionada às alterações endocrinológicas observadas nesses pacientes, assim como a alguns genes sensíveis à dose presentes no braço curto do cromossomo 18.

Brenk et al. (2007), em estudo realizado em quatro pacientes com deleções 18p de tamanhos de variaram de 1,6 a 13,8 Mb avaliados por CGH *array*, sugeriram que a região sensível à dose relacionada à deficiência de crescimento pós-natal e convulsões estaria localizada entre 18p11.32 e 18p11.23. Nessa região, o gene *USP14* (*Homo sapiens ubiquitin specific peptidases 14*), localizado em 18p11.32, pode estar relacionado a retardo do crescimento e convulsões, pois estudos em camundongos mostraram que a mutação do gene *Usp14* em homozigose resultou na redução da expressão da proteína e os animais apresentaram déficit de crescimento, alterações graves do comportamento, além de paralisia e tremor dos membros (Anderson et al., 2005). O gene *USP14* também está envolvido na regulação da atividade sináptica em mamíferos e em alterações neurológicas e comportamentais (Wilson et al., 2002).

5.2.1 Alterações neurológicas

Todos os pacientes do grupo I apresentaram a deleção do gene *TGIF1* (*TGFB-induced factor homeobox 1*), localizado em 18p11.31, mas apenas o paciente 4 com deleção de todo o braço curto apresentou hipófise ectópica, considerada por alguns autores como microforma de holoprosencefalia (HPE). Nenhum outro paciente da presente amostra apresentou a forma clássica ou microforma de HPE.

O gene *TGIF1* está associado ao espectro da HPE e suas microformas em função da proteína de homeo-domínio TGIF (*Transforming growth factor-beta induced factor*) que tem papel de regulação de transcrição na via de sinalização do TGF (*Transforming growth factor*) (Gripp et al., 2000; Portnoi et al., 2007).

A HPE e suas microformas estão descritas em pacientes com deleção 18p, ocorrendo em torno de 10% a 15% dos pacientes. Por outro lado, a síndrome da interrupção da haste hipofisária, que é um defeito de linha mediana caracterizada pela tríade haste hipofisária fina ou ausente, glândula pituitária ectópica e/ou hipoplasia da glândula pituitária anterior, que geralmente se manifesta na infância com hipoglicemia, micropênis e deficiência de hormônio

do crescimento, foi relacionada a mutações no gene *TGIF1*, sugerindo que o gene tem um papel em defeitos de linha mediana e não à HPE (Tatsi et al., 2013; Sebold et al., 2015).

Esses achados são reforçados pelo fato de que muitos pacientes com deleção 18p e deficiência de hormônio de crescimento descritos na literatura apresentam RMC normal (Sebold et al., 2015).

Outros autores consideram as anormalidades pituitárias como microformas de HPE e sugerem que outro gene da região, o gene *TWSG1* (*Twisted gastrulation homolog 1*) localizado em 18p11.22, quando em haploinsuficiência, pode modificar o fenótipo da HPE (Dubourg et al., 2004). Rosenfeld et al. (2010) realizaram o CGH array em 136 indivíduos com HPE e encontraram 22 indivíduos com deleção 18p, sendo que em metade dos casos apresentaram a deleção do *TGIF1* e de *TWSG1*, e pelo menos 1/5 apresentaram apenas a deleção do gene *TGIF1*.

Kauvar et al. (2011), em estudo sistemático para comprovar o papel do *TGIF1* e do *TWSG1* na HPE, não encontraram evidência de que o *TWSG1* seja um fator comum determinante ou associado que tenha efeito na HPE.

O verdadeiro papel dos genes *TGIF1* e *TWSG1*, na etiologia da HPE e das microformas da HPE, ainda é incerto.

Na presente amostra, apenas o paciente 4 apresentou hipófise ectópica com haste hipofisária hipoplásica, deficiência de hormônio de crescimento e micropênis, mas não apresentou hipoglicemia como esperado para a síndrome da interrupção da haste hipofisária.

Além do paciente 4, apenas a paciente 6 apresentou convulsões durante a infância representando aproximadamente 17% (2/12) da amostra. Esses dois pacientes apresentam deleções 18p semelhantes, de 15 Mb no paciente 4 e de 15,2 Mb na paciente 6, sendo que essa última também apresenta deleção terminal de 1,7 Mb em 18q. A literatura refere que cerca de 13% dos pacientes com deleção 18p pura apresentaram convulsões (Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015). Porém, nos casos de r(18), como no caso da paciente 6 do grupo II, a literatura relata que as convulsões ocorrem em torno de 26% dos pacientes (Spreiz et al., 2013; Carter et al., 2015). Além do gene *USP14* citado anteriormente, o gene *DLGAP1* (*Discs-large associated protein 1*), localizado em 18p11.31, faz parte da densidade pós-sináptica de células neuronais e também pode ser candidato para convulsões (Kim et al., 1997). O gene *DLGAP1*, porque o seu produto gênico (GKAP) faz parte da densidade pós-sináptica de células neuronais, poderia também estar relacionado às doenças do espectro autista (Kim et al., 1997; Bayes et al., 2011). Sebold et al. (2015) encontraram em sua amostra

39% de pacientes com alteração do espectro autista, sendo este achado um aspecto importante a ser considerado na avaliação comportamental dos pacientes com deleção 18p, mas não realizamos a avaliação do espectro autista em nossa amostra.

A microcefalia foi observada em três pacientes (25%) da presente amostra, sendo uma (pacientes 3) do grupo I, um (paciente 7) do grupo II e um (paciente 9) do grupo III.

O paciente 5 do grupo I, representando 8,3% da presente amostra, apresentou macrocefalia e os sete pacientes restantes apresentaram perímetro cefálico normal, representando 58,3% da amostra.

O paciente 9 do grupo III, com deleção de 5 Mb em 18p11.31 associada à duplicação de 16,7 Mb em 5q34, foi o único desse grupo a apresentar microcefalia muito abaixo do percentil 3 para a idade. Além disso, o paciente 9 apresenta grande restrição do crescimento, trigonocefalia por cranioestenose da sutura metópica e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor moderado, achados que serão discutidos posteriormente no tópico 5.2.10.2.2, referente ao fenótipo associado à duplicação 5q34.

Wester et al. (2006) não encontraram microcefalia em uma amostra de sete casos com deleção 18p, sendo que um dos pacientes relatados pelos autores apresentou HPE sem microcefalia associada.

Outros autores também relataram a HPE como a anomalia do SNC mais frequente na deleção 18p e, quando associada a outras anomalias do SNC, a frequência encontrada é em torno de 66% (Tabela 11) (Turleau 2006; Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015).

A macrocefalia é raramente relatada nos pacientes com deleção 18p. Liberfarb et al. (1979) relataram quatro pacientes com duplicação 1q42 associada à deleção 18p11 com macrocefalia relativa, porém esta manifestação fenotípica é observada na maioria dos pacientes com duplicação em 1q32 e nesse relato pode estar associada a essa duplicação e não à deleção 18p (Meloni et al., 2014-Apêndice 5).

Nos pacientes com r(18) da presente amostra, a microcefalia foi observada em 50% dos casos (1/2) enquanto na literatura a microcefalia é relatada em torno de 70% dos casos (Carter et al., 2015).

A hipotonia muscular, lentidão e outras alterações de tônus foram relatadas em torno de 84% dos pacientes com deleção 18p (Hasi-Zogaj et al., 2015). No presente trabalho observamos hipotonia muscular em 66% (8/12) e lentidão em 83% (10/12) dos pacientes.

Na região 18p11.31, deletada na maioria dos pacientes da presente amostra exceto no paciente 7, existem genes associados a fibras elásticas das células musculares envolvidas na

regulação da atividade contrátil como os genes *EMILIN2* (*elastin microfibril interfacer 2*), *MYOM1* (*myomesin 1*) e *MYL12B* (*myosin, light chain 12B*), os quais podem ser responsáveis pela hiperflexibilidade articular e hipotonia muscular destes pacientes (Guilherme et al., 2014).

A literatura relata que alterações variadas na substância branca são observadas em torno de 48% dos casos com deleção 18p. Dentre as anormalidades de substância branca descritas na literatura estão: atraso de mielinização, diminuição localizada da espessura da substância branca, alterações de sinal devido a insulto isquêmico e acentuação de sinal em T2 (Sebold et al., 2015), sendo estes achados semelhantes aos encontrados no presente estudo. No item 4.3 descrevemos as alterações na substância branca observadas nos pacientes que realizaram ressonância magnética de crânio (pacientes 2, 3, 4, 6, 7 e 8), sendo que os achados encontrados podem ter influenciado nas manifestações neurológicas observadas nestes pacientes.

5.2.2 Malformações cardíacas

No presente estudo quatro pacientes (33%) apresentaram malformação cardíaca.

No grupo I, duas pacientes (pacientes 1 e 2) apresentaram forame oval pérvio ao nascimento, com fechamento espontâneo observado na paciente 2.

No grupo II, os dois pacientes com r(18) apresentaram alteração cardíaca (100%), sendo que a paciente 6 apresentou espessamento da valva aórtica e o paciente 7 apresentou comunicação intra-atrial e intra-ventricular, que necessitou de correção cirúrgica.

No grupo III, todos os cinco pacientes apresentaram avaliação cardiológica com ecocardiograma normal.

Na literatura, a frequência de anomalias cardíacas na deleção 18p é maior que a esperada na população e está em torno de 10 a 56%, porém a diversidade das anomalias cardíacas encontradas é muito grande. Há relatos desde formas mais leves de anomalias cardíacas como o forame oval pérvio até cardiopatias complexas como a tetralogia de Fallot e transposição de grandes vasos (Pearl et al., 1989; Sebold et al., 2015).

Nos pacientes com r(18), a frequência de anomalias cardíacas parece ser maior que nos indivíduos com deleção 18p na literatura e o mesmo ocorreu nos pacientes desta amostra. A frequência aumentada para cardiopatias no grupo II pode estar relacionada com outros fatores como mosaicismos somáticos e instabilidade do anel (Carter et al., 2015).

5.2.3 Alterações ortopédicas

Com relação às alterações ortopédicas, os pacientes da presente amostra apresentaram: escoliose (6/12), cifoescoliose (1/12), pectus excavatum (1/12), pé torto (2/12), coxa vara (2/12), polegares de implantação baixa (3/12), braquidactilia com mãos largas (8/12), clinodactilia do 5º dedo das mãos (8/12). As alterações ortopédicas encontradas nesta amostra são semelhantes às descritas na literatura.

O paciente 10 apresentou cifoescoliose e sua irmã, a paciente 11, apresentou escoliose, ambos com a deleção 18p11.31 associada à duplicação 9p13.1. A escoliose não é descrita em pacientes com a duplicação 9p pura e esse achado sugere que a escoliose ocorra por alteração dos genes da região deletada do cromossomo 18.

Nos outros pacientes da amostra que apresentam escoliose (pacientes 2, 3, 4 e 12) o ponto de quebra está mais próximo à região centromérica e em todos esses pacientes a deleção engloba a região sugerida como responsável por escoliose e/ou cifose considerada em 18p11.31 (coordenadas: 2-2,931,532) descrita na literatura (Hasi-Zogaj et al., 2015) (Figura 1 e Tabela 2).

5.2.4 Alterações genito-urinárias

Com relação às anomalias genito-urinárias, três pacientes da amostra apresentaram alterações, sendo todos do sexo masculino.

O paciente 4 do grupo I apresentou micropênis e infecção urinária de repetição, o paciente 7 com r(18) apresentou pênis pequeno, hipospádia de III grau, escroto bífido, testículo palpável à direita e retrátil à esquerda e o paciente 8 do grupo III apresentou hipospádia peno-escrotal.

A anomalia urogenital mais descrita na literatura é a criptorquidia e está mapeada na região 18p11.32p11.31 (coordenadas: 2-5,520,172) (Tabela 2).

No paciente 4 destacamos anteriormente o papel do gene *TGIF1* e da síndrome interrupção da haste hipofisária que também cursa com micropênis. Nessa região, além do gene *TGIF1*, estão os genes *THOC1* (*THO complex 1*) e *CETN1* (*CENTRIN 1*), que podem estar envolvidos no desenvolvimento testicular anormal (Wang et al., 2009; Hasi-Zogaj et al., 2015).

O paciente 7, com r(18), apresenta pênis pequeno, hipospádia de III grau e escroto bífido. Além de deletados os genes *THOC1* e *CETN1* em 18p, a deleção 18q nesse paciente engloba o gene *CYB5A* (*Cytochrome b5, type A - microsomal*).

Mutações em homozigose no gene *CYB5A* resultam em deficiência da 17,24 liase que causam infertilidade, desenvolvimento sexual anormal em homens e meta-hemoglobinemias tipos I e II. A literatura relata que em torno de 50-57% dos pacientes do sexo masculino com r(18) e deleção 18q apresentam anormalidades genito-urinárias incluindo criptorquidia, hipospádia e/ou micropênis, mas a deficiência de 17,24 liase é raramente descrita, sendo provável que a deficiência ocorreria apenas quando a deleção revelasse uma mutação recessiva no outro cromossomo 18 (Cody et al., 2015).

5.2.5 Alterações gastrointestinais

Na presente amostra quatro pacientes relataram constipação crônica (pacientes 2, 3, 8 e 10), sendo esta a alteração gastrointestinal mais relatada nos pacientes com deleção 18p na literatura. No mapeamento clínico realizado para regiões candidatas no banco de dados do Genome Browser, a constipação crônica está relacionada com a região terminal do braço curto do cromossomo 18.

Os pacientes 1 (grupo I) e 7 (grupo II) apresentaram implantação proximal do ânus, anomalia relatada anteriormente na literatura em pacientes com r(18) como no caso do paciente 7. Não encontramos outras alterações gastrointestinais nos pacientes desta amostra.

5.2.6 Anomalias oftalmológicas

Dentre as anomalias oftalmológicas, ptose (8/12, constituindo aproximadamente 67%) e estrabismo (12/12, representando 100%) foram as alterações mais observadas na presente amostra e são frequentemente relatadas na literatura.

A avaliação do fundo de olho do paciente 9 mostrou rarefação difusa inespecífica do epitélio pigmentar da retina em ambos os olhos, achado oftalmológico descrito nos pacientes com deleção 18p descritos na literatura.

Os pacientes deste trabalho não foram avaliados para defeitos de refração e a detecção de alterações frequentemente relatadas na literatura como astigmatismo e miopia foi prejudicada por isso. A literatura relata em torno de 6% de catarata congênita nos pacientes com deleção 18p, mas não detectamos essa anomalia nos pacientes da presente amostra.

5.2.7 Deficiência auditiva

Três pacientes (pacientes 3, 4 e 8) deste estudo realizaram avaliação audiológica, sendo que dois pacientes (3 e 4) apresentaram audiometria normal.

O paciente 8 apresentou deficiência auditiva por infecção crônica do ouvido direito, que evoluiu para mastoidite crônica. A mastoidectomia radical à direita foi realizada aos 34 anos de idade, com recuperação de parte da audição no ouvido direito com uso de aparelho auditivo.

Embora a avaliação audiológica tenha sido solicitada para todos os pacientes da amostra, as famílias apresentaram grande dificuldade para realizar as avaliações necessárias.

A literatura relata em torno de 23% de pacientes com deleção 18p que apresentam deficiência auditiva. A deficiência auditiva não sindrômica 46 está mapeada na região 18p11.32-p11.31 com 24 genes no intervalo, sendo que quatro desses genes são candidatos para essa forma de deficiência auditiva: o *ZFP161* (*Zinc finger protein 161 homolog*) que é expresso na cóclea fetal, o *MRLC2* (*myosin regulatory light chain-2*), o *MRLC3* (*myosin regulatory light chain-3*) e *MYOM1* (*myomesin 1*), sendo o mapeamento o primeiro passo para a definição da causa gênica da doença (Mir et al., 2005) (Figura 1).

5.2.8 Alterações endocrinológicas

Dentre as alterações endocrinológicas observadas nos pacientes da amostra, o hipotireoidismo foi o mais observado, sendo que ocorreu em três dos cinco pacientes do grupo I, nos dois pacientes com r(18) do grupo II e em um dos cinco pacientes do grupo III, de forma que no total, seis pacientes da amostra (50%) apresentaram hipotireoidismo.

Além disso, três pacientes do grupo III apresentam dosagens séricas sugestivas de hipotireoidismo subclínico e mantinham-se em observação clínica e laboratorial para iniciar o tratamento se necessário até a data da última avaliação clínica. Esses achados confirmam os dados da literatura de alto risco para manifestar hipotireoidismo nos pacientes com deleção 18p.

O paciente 4 apresentou, além do hipotireoidismo, deficiência de hormônio de crescimento por apresentar hipófise ectópica e foi realizada a reposição do hormônio de crescimento até os 18 anos de idade, mantendo a reposição de hormônio tireoidiano até a data da última avaliação clínica.

O paciente 9 do grupo III, com deleção 18p associada à duplicação 5q, apresentou dosagens séricas de IGF1-somatomedina C diminuídas. Esse paciente foi encaminhado para avaliação e seguimento endocrinológicos, mas não obtivemos os resultados, pois o paciente não retornou para reavaliação clínica no ambulatório.

5.2.9 Alterações dermatológicas

Na presente amostra, cinco pacientes (pacientes 2, 3, 5, 10 e 12) apresentaram queratose pilar de graus variados de leve a extensa. Desses pacientes, dois (pacientes 2 e 5) apresentaram, além da extensa queratose pilar, *ulerythema ophryogenes*.

A queratose pilar ocorre por excessiva queratinização folicular geneticamente determinada, geralmente limitada a locais típicos (dorso, braços e coxas) e é uma manifestação comum na população.

O *ulerythema ophryogenes* (*keratosis pilaris atrophicans faciei*) manifesta-se raramente e é caracterizado por pápulas faciais queratóticas em torno dos olhos e nariz e com base eritematosa. Ambas as manifestações dermatológicas fazem parte de um grupo de doenças hereditárias de queratinização do folículo capilar e envolvem inflamação folicular com a atrofia subsequente.

A associação entre a deleção 18p e a queratose pilar/*ulerythema ophryogenes* foi relatada por vários autores (Zouboulis et al., 1994; Nazarenko et al., 1999; Zouboulis et al., 2001; Carvalho et al., 2011).

Zouboulis et al. (1994; 2001) foram os primeiros a associarem a queratose pilar/*ulerythema ophryogenes* à região 18p e posteriormente ao gene *LAMA1* (*Laminin, alpha 1*).

Liakou et al. (2014) revisaram todos os casos descritos com a tríade queratose pilar/*ulerythema ophryogenes* e deleção 18p e sugeriram que o reconhecimento clínico dessa associação poderia sugerir o diagnóstico da deleção 18p e poderia estar relacionada a uma mutação recessiva no gene *LAMA1* no cromossomo 18 normal revelada pela deleção 18p.

Hasi-Zogaj et al. (2015), em amostra de 91 pacientes com deleção 18p, encontraram sete pacientes com queratose pilar, mas não encontraram pacientes com *ulerythema ophryogenes*. Por outro lado, indivíduos com mutações em homozigose, assim como heterozigotos compostos para o gene *LAMA1*, foram diagnosticados com a síndrome de Poretti-Bolthausen caracterizada por anomalias cerebelares, alta miopia, distrofia retiniana, anormalidades oculares e atraso do desenvolvimento (Aldinger et al., 2014).

Hasi-Zogaj et al. (2015) sugeriram que, do ponto de vista teórico, raros indivíduos com deleção 18p poderiam apresentar manifestações da síndrome de Poretti-Bolthausen caso revelem uma mutação recessiva no gene *LAMA1* no outro cromossomo 18 normal.

5.2.10 Dismorfologia

5.2.10.1 Pacientes do grupo I

Na presente amostra, os pacientes do grupo I apresentaram o fenótipo dismórfico mais concordante dentre os pacientes estudados.

Em relação às dismorfias faciais, observamos um padrão representado por fâscies arredondada (4/5), fâscies hipoexpressiva (5/5), hipertelorismo ocular (5/5), estrabismo (5/5), macrostomia (4/5); comissuras da boca inclinadas para baixo (5/5), cáries dentárias (5/5) e orelhas grandes e/ou com pavilhão anteriorizado (4/5). Dentre as anomalias esqueléticas encontradas destacam-se mãos largas com dedos curtos (3/5) e escoliose (3/5). Os genitais foram normais nas mulheres e um dos homens apresentou genital hipoplásico (1/2) (Tabela 3).

Na figura 30 foram agrupados os cinco pacientes com deleções em 18p de 12,3 a 15,2 Mb, todos com o ponto de quebra em 18p11.21, por apresentaram aspecto semelhante do ponto de vista gestáltico facial. Dentre as dismorfias faciais semelhantes observadas, destacamos: ptose palpebral, hipertelorismo ocular, estrabismo divergente, comissura labial com cantos voltados para baixo, orelhas grandes e retroposicionadas e pescoço curto. Desses cinco pacientes só três apresentam a deleção pura, porém todos apresentam o mesmo ponto de quebra em 18p11.21 (Figura 30), sugerindo que esta região é crítica para o fenótipo facial.

Na figura 31 observamos os pacientes 1 e 5 do grupo I, que apresentaram deleção de 8,1 Mb até 18p11.23 e constatamos que as dismorfias faciais são mais suaves do que as observadas nos pacientes com deleção 18p com o ponto de quebra em 18p11.21, dificultando a suspeita da deleção 18p, como descrito na literatura. No paciente 5 da presente amostra o diagnóstico da deleção 18p foi realizado só aos 23 anos de idade, evidenciando esta dificuldade.

Hasi-Zogaj et al. (2015) relataram semelhança entre os pacientes com deleção 18p de acordo com os pontos de quebra (na região centromérica e regiões mais distais em relação ao centrômero), achados semelhantes aos encontrados por este estudo.

Turleau (2008) relatou que, pelo aspecto inespecífico facial dos pacientes com deleção 18p, exceto por um pequeno subgrupo de daqueles que apresentam malformações graves relacionados ao espectro da HPE, o diagnóstico pode não ser evidente no nascimento, pois o fenótipo não é característico como para outras síndromes cromossômicas mais frequentes.

Outros autores reforçam essa afirmação e pontuam que as características faciais e corporais encontradas nos pacientes com deleção 18p, além de inespecíficas, são

frequentemente observadas na população em geral e nem sempre são observadas em todos os pacientes com deleção 18p (Wester et al., 2006; Koç et al., 2008; Hasi-Zogaj et al., 2015; Sebold et al., 2015). Além disso, todos os autores também descrevem uma grande variedade nos achados clínicos, no grau da deficiência intelectual e no comportamento dos pacientes.

Sebold et al. (2015) procuraram minimizar os efeitos da grande variedade de manifestações, atribuídas em geral à heterogeneidade genética da região em hemizigose e às diferenças moleculares, avaliando muitos pacientes com deleção 18p com o mesmo ponto de quebra na região centromérica, porém mesmo nessa amostra a variabilidade das manifestações clínicas persistiu. Isto nos leva à hipótese de que muitos genes da região 18p, quando em hemizigose, causam fenótipos de baixa penetrância (Sebold et al., 2015).

Outros fatores como a presença de CNVs (do inglês, *Copy Number Variations*) patogênicas além da deleção 18p no paciente poderiam influenciar no agravamento do fenótipo da deleção 18p. Por exemplo, a paciente 3 apresenta, além da deleção de 15 Mb em 18p (coordenadas: 434,686-15,133,714) (Figura 19), a duplicação de 680 kb em 18q (coordenadas: 27,397,123-28,076,687). Essa região de 680 kb em 18q12.1, tanto duplicada quanto deletada, corresponde a uma CNV patogênica, na qual encontra-se um microRNA (MIRN302F; hsa-mir-302f) e foi descrita em vários pacientes em bancos de dados como o Genome Browser (do inglês, *UCSC Genome Browser website*), o ClinGen (do inglês, *Clinical Genome Resource*) e DECIPHER (do inglês, *DatabasE of genomiC varIation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) em pacientes com hérnia diafragmática, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dismorfias com fenótipo variável e poderia interferir no fenótipo da paciente agravando as manifestações clínicas apresentadas.

5.2.10.2 Pacientes do grupo II

Os pacientes do Grupo II são dois pacientes com r(18) que apresentaram deleções com diferentes pontos de quebra, com deleções tanto de 18p como de 18q.

A paciente 6 apresentou deleção de 15,3 Mb até a banda 18p11.21 e a deleção de 1,7 Mb na banda 18q23 e o fenótipo similar aos pacientes com deleção 18p pura com mesmo ponto de quebra.

Além das características faciais já discutidas no item 5.2.11.1 e na figura 30, a paciente 6 apresentou vários outros sinais clínicos e comorbidades observados nos pacientes com deleção 18p como, por exemplo, lentidão, hipotonia muscular, atraso de aquisição de linguagem, convulsões, dosagem sérica de IgA diminuída e hipotireoidismo.

O paciente 7 apresentou uma deleção pequena (1,3 Mb) no braço curto do cromossomo 18 e uma deleção maior (11,1 Mb) no braço longo do cromossomo 18, de forma que apresenta um fenótipo facial semelhante aos pacientes com deleção 18q. Esses pacientes com cromossomo 18 em anel foram publicados em colaboração com Spreiz et al. (2013- Apêndice 1).

Spreiz et al. (2013) realizaram a caracterização clínica e molecular por SNP *array* (do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism array*) de nove pacientes com r(18) e relataram que um fenótipo típico não foi caracterizado, sendo que as manifestações clínicas observadas dependiam dos segmentos do cromossomo 18 envolvidos. Além das deleções terminais em 18p e 18q, os autores encontraram regiões duplicadas em dois pacientes da amostra reforçando a importância do estudo citogenômico. Os autores também sugeriram que a interação e a modificação da expressão dos genes afetados são igualmente ou até mais importantes para a determinação do fenótipo do que apenas as deleções encontradas.

Esses achados foram confirmados por Carter et al. (2015) que relataram 30 pacientes com r(18) e encontraram vários pacientes com pequenas duplicações próximas aos pontos de quebra em 18p.

Os dois trabalhos citados acima concluem que cada indivíduo com r(18) apresenta uma constituição cromossômica única e que essa diversidade citogenômica observada torna muito difícil a correlação genótipo-fenótipo nesses pacientes.

Soileau et al. (2015) avaliaram adultos com anormalidades do cromossomo 18, sendo que os autores utilizaram os mesmos pacientes com r(18) da amostra de Carter et al. (2015), além de pacientes com tetrassomia 18p, deleções 18p e 18q. Nesse trabalho, os pacientes foram avaliados do ponto de vista neuropsicológico, comportamental e expectativa de vida, sendo que os autores confirmaram a dificuldade em se definir a correlação genótipo-fenótipo nos pacientes.

Soileau et al. (2015) observaram que a expectativa de vida dos pacientes com r(18) da amostra foi significativamente menor do que a encontrada nos indivíduos com tetrassomia 18p, deleções 18p ou 18q, sugerindo que os pacientes com r(18) apresentam quadro clínico e comorbidades mais graves comprometendo a sua longevidade (Carter et al., 2015; Soileau et al., 2015).

5.2.10.2 Pacientes do grupo III

Os cinco pacientes do Grupo III constituem o grupo mais heterogêneo do presente estudo, pois apresentaram a deleção 18p associada a outro cromossomo duplicado ou deletado.

Os outros cromossomos envolvidos nos desequilíbrios desses pacientes foram: duplicação em 16p, 5q e 9p e deleção em 21q.

O fenótipo desses pacientes está relacionado à deleção 18p, mas também influenciado pela duplicação ou deleção associada e são discutidos abaixo.

5.2.10.2.1 Paciente 8

O paciente 8 apresentou uma deleção de 5,4 Mb do braço curto do cromossomo 18 até a banda p11.31 (coordenadas em 18p: 1,543-5,385,430) e uma duplicação de 6,5 Mb do braço longo do cromossomo 16 até a banda q23.3 (coordenadas em 16q: 82,328,651-88,815,024).

Na região deletada do cromossomo 18 nesse paciente estão mapeados 87 genes, sendo 30 genes relacionados a fenótipos do OMIM dentre eles: *TGIF1*, *ADCYAP*, *THOC1*, *CETN1*, *LIPN2* e o *SMCHD1*. Já discutimos anteriormente, no item 5.2.4, alguns achados como a hipospádia e criptorquidia encontradas no paciente 8 e a possível relação desses achados clínicos com os genes *THOC1* e *CETN1*.

Na região duplicada do cromossomo 16 há 149 genes, sendo que 30 estão relacionados a fenótipos do OMIM. Dentre esses genes duplicados destacamos: *FOXF1* (*forkhead box F1*), *IRF8* (*Interferon regulatory factor 8*), *CYBA* (*Cytochrome b-245, alpha polypeptide*), *IL17C* (*interleukin 17C*) e *FBXO31* (*F-box protein 31*).

Mutações de ponto e deleções genômicas envolvendo o gene *FOXF1* têm sido relatadas como causa da displasia alvéolo-capilar com desalinhamento das veias pulmonares (ACDMPV; OMIM 265380) que é uma doença neonatal letal rara. A maioria desses pacientes também apresenta anomalias extra-pulmonares envolvendo os sistemas gastrointestinal, cardiovascular e genitourinário.

Dharmadhikari et al. (2014) relataram recentemente uma duplicação em 16q24.1 envolvendo o gene *FOXF1* em quatro famílias não relacionadas que apresentaram atraso de linguagem, deficiência intelectual e anomalias gastrointestinais, mas sem alterações pulmonares, sugerindo que as alterações encontradas estão relacionadas com a expressão aumentada do gene *FOXF1*. Além disso, os autores propõem que pacientes com alterações de

má-rotação intestinal, estenose pilórica ou duodenal e agenesia de bexiga sejam investigados para mutações em *FOXF1* e CNVs (Dharmadhikari et al., 2014).

O gene *IRF8* é um fator de transcrição da família dos fatores de transcrição do interferon que inclui os genes *IRF1*, *IRF2* e *ISGF3*. Mutações no gene *IRF8* podem causar a imunodeficiência 32A, que pode se manifestar tanto por herança autossômica recessiva quanto dominante e causa uma imunodeficiência grave caracterizada pela perda completa ou seletiva dos fagócitos mononucleares, respectivamente. Essa doença produz um quadro com ausência de monócitos, mieloproliferação de precursores de granulócitos e graves infecções oportunistas por fungos (Hambleton et al., 2011).

O gene *CYBA* codifica a cadeia leve da subunidade alfa do citocromo B que foi proposto como sendo um dos principais componentes microbicida do sistema de fagócitos. Mutações neste gene estão associadas à doença granulomatosa crônica de herança autossômica recessiva, caracterizada pela falência na ativação dos fagócitos.

A proteína codificada pelo gene *IL17C* é uma citocina derivada de células T com expressão restrita para as células T ativadas. Esse gene interfere na regulação de doenças inflamatórias e promove a diferenciação celular dos linfócitos Th 17 (Chang et al., 2011).

O gene *FBXO31* é um membro da família F-box e codifica uma proteína que pode ter um papel na regulação do ciclo celular, bem como no crescimento dendrítico e na migração neuronal, sendo que uma variante do gene foi descrita em uma família paquistanesa com a deficiência intelectual autossômica recessiva-45 (MRT45;615979) (Mir et al., 2014).

5.2.10.2.2 Paciente 9

O paciente 9 apresentou deleção de 5 Mb até a banda 18p11.31 associada à duplicação de 16,7 Mb desde a banda 5q34 com um quadro clínico com acentuada restrição do crescimento, trigonocefalia por cranioestenose da sutura metópica e atraso moderado do desenvolvimento neuropsicomotor.

A região de 16,7 Mb duplicada em 5q34q35 desse paciente (coordenadas em 5q: 163,791,389-180,491,461) apresenta 285 genes, sendo que 30 estão relacionados a doenças do OMIM, incluindo os genes *NSD1* (*Homo sapiens nuclear receptor binding SET domain protein 1*), *MSX2* (*Homo sapiens msh homeobox 2*) e o *RARS2* (*Homo sapiens arginil-tRNA synthetase 2*).

Mutações e microdeleções envolvendo o gene *NSDI* causam a síndrome de Sotos, mas microduplicações envolvendo esta região causam uma síndrome de microcefalia, baixa estatura e atraso de desenvolvimento.

A duplicação que engloba a região 5q33.3-q34 tem sido descrita em raros pacientes que apresentam déficit pondero-estatural, fronte proeminente, filtro longo, lábio superior fino, boca com comissuras labiais voltadas para baixo, micrognatia, orelhas de implantação baixa e malformação cardíaca (Fujita et al., 2013).

Rosenfeld et al. (2013) descreveram 12 pacientes com duplicação intersticial de 5q35 variando de 370 kb a 3,7 Mb que apresentaram microcefalia, déficit pondero-estatural variando de abaixo da média a grande restrição do crescimento. Os autores relataram que, mesmo os pacientes com duplicações menores da amostra descrita, que não incluíam o gene *MSX2*, também apresentaram cranioestenose. Mutações no gene *MSX2* podem causar a cranioestenose 2 tipo Boston.

Dentre as consequências genômicas das CNVs está também a ocorrência de fenótipos opostos causados por deleções e duplicações de uma mesma região cromossômica, como por exemplo, a duplicação 17p11.2 para a síndrome de Potocki-Lupski e a deleção 17p11.2 para a síndrome de Smith-Magenis. O fenômeno de fenótipos opostos também pode ocorrer em doenças causadas por mutações gênicas com ganho ou perda de função, como por exemplo, no gene *FGFR3* onde o ganho de função causa acondroplasia e outras displasias esqueléticas e a perda de função causa estatura elevada na síndrome CATSHL (camptodactilia, alta estatura e deficiência auditiva) (Toydemir et al., 2006).

No desenvolvimento craniano, o ganho de função do *MSX2* causa cranioestenose, enquanto a perda de função ou deleção causa o foramina parietal (Rosenfel et al., 2012).

Mutações em homozigose do gene *RARS2*, outro gene presente na região duplicada do cromossomo 5 no paciente 9, causam leucoencefalopatia e hipomielinização evidenciadas em imagens por ressonância magnética de crânio do paciente (Wolf et al., 2014).

A deleção de 5 Mb em 18p (coordenadas: 11,542-5,003,537) encontrada no paciente engloba 53 genes, sendo que 30 deles apresentam fenótipos relacionados do OMIM, dentre eles destacamos os genes: *THOC1*, *CETN1*, *ADCYAP1* e o *TGIF1*.

Nesse paciente, temos a impressão que a duplicação 5q34q35 parece ser predominante nas manifestações fenotípicas apresentadas.

5.2.10.2.3 Pacientes 10 e 11

Os pacientes 10 e 11 são irmãos, compartilham os mesmos desequilíbrios cromossômicos distais com deleção de 6,4 Mb em 18p e duplicação de 44,5 Mb em 9p.

Os pacientes foram publicados por Guilherme et al. (2014-Apêndice 3) com outros três pacientes que apresentaram duplicação 9p, constituindo-se os pacientes 4 e 5 respectivamente da publicação.

A síndrome da trissomia 9p foi descrita por Rethoré et al (1970) e apresenta fenótipo com aspecto facial característico e anomalias digitais. Outros achados clínicos incluem baixa estatura, micro/braquicefalia, fendas palpebrais oblíquas para baixo, hipertelorismo ocular, pescoço largo e curto, nariz proeminente, filtro curto, comissuras labiais voltadas para baixo, orelhas de implantação baixa, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual de graus variados. Muitos desses desvios fenotípicos também constituem sinais da síndrome da deleção 18p, mas as anomalias de mãos e pés observadas na trissomia 9p são hipoplasia ungueal acentuada com braquiladactilia e clinodactilia de quinto dedo, diferentes do fenótipo observado na deleção 18p. Os pacientes 10 e 11 apresentam hipoplasia ungueal acompanhada de hipoplasia das falanges distais dos pés bilateralmente, visualizadas no estudo radiológico.

Além disso, o maior comprometimento intelectual observado nesses pacientes pode ter sido mais influenciado pelo segmento duplicado em 9p do que pela deleção 18p, já que os pacientes com deleção 18p com pontos de quebra mais distais ao centrômero, como também observado nos pacientes da presente amostra, podem apresentar melhor desempenho intelectual (Wester et al., 2006; Willoughby et al., 2014).

A região duplicada de 44,5 Mb no braço curto do cromossomo 9 (coordenadas em 9p: 203,861-44,765,785) apresenta 654 genes, sendo que 28 estão relacionados a fenótipos do OMIM, incluindo os genes, *DMRT1* (*doublesex- and mab-3-related transcription fator 1*) e *DMRT2* (*doublesex- and mab-3-related transcription fator 2*) relacionados ao desenvolvimento gonadal; *PSIP1* (*PC4 and SFRS1 interacting protein 1*), *SIGMAR1* (*Sigma non-opioid intracellular receptor 1*), *PAX5* (*Paired box 5*) e *CNTNAP3* (*Contactin associated protein like-3*), todos genes envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso central e responsáveis por processos de aprendizado, memória e alteração de humor.

Os genes descritos acima estão relacionados a doenças quando deletados ou mutados. Como nos pacientes deste estudo os genes estão duplicados, é possível que a superexpressão interfira com elementos regulatórios e contribuam para o fenótipo (Guilherme et al., 2014).

5.2.10.2.4 Paciente 12

O paciente 12 apresenta deleção distal de 14 Mb em 18p, até a banda 18p11.21, associada à deleção do braço curto do cromossomo 21 e de 353 kb da região proximal do braço longo do cromossomo 21.

A deleção de 18pter a 18p11.21 confere ao paciente um quadro clínico e fenótipo semelhante aos pacientes do grupo I com ponto de quebra na mesma região.

No cromossomo 21, a deleção afeta 58 genes, sendo que dois estão relacionados a fenótipos do OMIM, incluindo os genes *POTED* (*POTE Ankyrin domain family, member D*) e *TPTE* (*Transmembrane phosphatase with tensin homology*).

O gene *POTED* faz parte da família de genes POTE que se expressa na próstata, ovário, testículos, placenta e também relacionados a câncer de próstata e leucemia. O gene *TPTE* codifica uma tirosina-fosfatase que pode desempenhar um papel na função endócrina ou na espermatogênese do testículo, mas não há doença reconhecidamente relacionada a nenhum desses genes.

Na tabela 14 estão relacionados alguns dos genes encontrados nos desequilíbrios genômicos dos pacientes 8, 9, 10, 11 e 12 associados à deleção 18p, assim como as doenças relacionadas a esses genes.

A avaliação detalhada do fenótipo desse grupo III através da correlação com os achados citogenômicos mostrou a importância de se avaliar todos os segmentos cromossômicos envolvidos. O conteúdo gênico de cada segmento envolvido foi o que definiu o fenótipo clínico, mostrando que tanto o segmento deletado quanto o duplicado foram importantes, diferentemente do conceito corrente na clínica de que o segmento deletado é o mais definitivo para o fenótipo. No caso dos pacientes 8, 9, 10 e 11, verificamos que as duplicações representaram papel importante na definição fenotípica dos pacientes.

5.2.10.2.5 Outros genes da região do braço curto do cromossomo 18 que podem influenciar o fenótipo da síndrome

Mutações dos genes localizados no braço curto do cromossomo 18 têm sido relacionadas a várias doenças de início tardio e relatadas em pacientes com deleção 18p, como por exemplo, a distonia primária-25 associada ao gene *GNAL* (*Guanine nucleotide binding protein-G protein*) (Grazadio et al., 2009; Postma et al., 2009; Fuchs et al., 2013; Esposito et al., 2014). Outras doenças de início tardio como ataxia espinocerebelar tipo-28 associada ao gene *AFG3L2* (*AFG3-like-AAA-ATPase-2*) e distrofia muscular fascioscapulohumeral tipo-2

associada ao gene *SMCHD1* (*Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1*) também foram descritas em pacientes com deleção 18p (Myers et al., 2014; Lemmers et al., 2015).

Desta forma, os pacientes com deleção 18p podem apresentar risco aumentado para a manifestação de doenças neurológicas de aparecimento tardio (Di Bella et al., 2010; Hasi-Zogaj et al., 2015; Lemmers et al., 2015; Sebold et al., 2015). Alguns pacientes com deleção 18p envolvendo os genes *GNAL* e *AFG3L2* apresentaram as manifestações neurológicas mais precocemente que os pacientes que manifestaram a doença por mutação gênica e que não tem a deleção 18p.

Frente a esses achados, o monitoramento neurológico dos pacientes com deleção 18p na procura por sinais e sintomas precoces dessas doenças torna-se primordial (Esposito et al., 2014; Myers et al., 2014; Lemmers et al., 2015).

Na tabela 16 relacionamos as doenças com base molecular já conhecida que estão mapeadas no braço curto do cromossomo 18 (Tabela 16).

Tabela 16: Doenças em que a base molecular é conhecida e os genes estão localizados no braço curto do cromossomo 18

OMIM	Genes	Fenótipo
602630	<i>TGIF</i>	Holoprosencefalia-4
614982	<i>SMCHD</i>	Distrofia Muscular Fascioscapulohumeral tipo 2
605519	<i>LPIN2</i>	Síndrome de Majeed
150320	<i>LAMA1</i>	Síndrome de Poretti-Boltshauser
600532	<i>NDUFV2</i>	Deficiência mitocondrial complexo 1
607479	<i>APCDD1</i>	Hipotricose 1
607479	<i>PIEZO2</i>	Síndrome de Marden-Walker; Artrogripose distal tipos 3 e 5
139312	<i>GNAL</i>	Distonia tipo 25
604581	<i>AFG3L2</i>	Ataxia espástica autossômica recessiva tipo 5; Ataxia espinocerebelar 28
607397	<i>MC2R</i>	Deficiência de glicocorticóide por falta de resposta ao ACTH

Fonte: UCSC Genome Browser database (<https://genome.ucsc.edu>)

5.2.11 Avaliação neuropsicológica

Os resultados da avaliação neuropsicológica da amostra como um todo revelaram que o melhor desempenho em relação às medidas de inteligência, de habilidades adaptativas e de

problemas comportamentais foi apresentado pelo paciente 5 (grupo I), com deleção pura de 8,1 Mb e com ponto de quebra em 18p11.23.

Na paciente 1, que apresentava as mesmas características citogenômicas, a avaliação foi prejudicada em função do abandono do seguimento pela família. Cabe lembrar, que aos três anos de idade, ela foi avaliada quanto ao neurodesenvolvimento pela escala Denver-II e quanto ao comportamento adaptativo pela escala de Vineland II, e os resultados mostraram apenas discreto atraso nos aspectos de motricidade fina.

O paciente 5 apresentou QIT 83, considerado dentro da normalidade (médio inferior), bem como as condições sociais e econômicas mais favoráveis de toda a amostra. Por ocasião da investigação neuropsicológica, ele vivia com seus pais, havia terminado o ensino médio e trabalhava em período parcial, situação social que pode ter contribuído para o seu desenvolvimento global.

Os outros pacientes do grupo I (pacientes 2, 3 e 4) apresentaram ponto de quebra em 18p11.21 com deleções que variaram de 12,3 a 15 Mb, sendo que todos apresentaram alterações neurológicas associadas.

Nas pacientes 2 e 3, a ressonância magnética de crânio mostrou alterações da substância branca. A paciente 3 apresentava também microcefalia observada ao exame clínico. A avaliação do desempenho intelectual revelou um QIT 53 na paciente 2 e 65 na paciente 3, ambas com deficiência intelectual, sendo que a paciente 2 apresentou os escores mais baixos dentre os pacientes do grupo I. As alterações neurológicas observadas na RMC apresentadas por ambas provavelmente contribuíram para o maior comprometimento cognitivo. Por outro lado, no caso da paciente 3, as condições sócio-econômicas de risco observadas, também podem ter prejudicado seu desenvolvimento, sendo que esta paciente também apresentou problemas comportamentais internalizantes relacionados à ansiedade, retraimento/depressão e queixas somáticas (Tabela 6).

O paciente 4 apresentou convulsões na infância e a ressonância magnética de hipófise revelou hipófise ectópica, mas mesmo apresentando comprometimento neurológico demonstrou desempenho intelectual em níveis limítrofes com QIT 77. O ambiente familiar e social desse paciente mostrou-se muito favorável e pode ter influenciado seu melhor desenvolvimento.

Quanto aos pacientes do grupo II com r(18) (pacientes 6 e 7), foi possível avaliar a paciente 6 que apresentou QIT 50 com deficiência intelectual. Essa paciente também

apresentou problemas comportamentais internalizantes relacionados à ansiedade, além de problemas de socialização (Tabela 6).

No paciente 7 não foi possível obter uma quantificação precisa do QI como explicado anteriormente. O paciente 7 apresenta r(18) com deleção 18p de 1,3 Mb com ponto de quebra em 18p11.32, sendo a menor deleção da amostra, por outro lado apresenta a deleção 18q22.2-q23 de 11,1 Mb, região que apresenta vários genes envolvidos com deficiência intelectual (Cody et al., 2009b).

Spreiz et al. (2013) relataram uma amostra de nove pacientes com r(18) e observaram que tanto a correlação genótipo-fenótipo, quanto um fenótipo típico para r(18) não puderam ser caracterizados, mas consideraram que o atraso do desenvolvimento e a severidade do quadro clínico estão relacionados com o tamanho das deleções em 18p e 18q. Como já relatado, os dois pacientes da presente amostra fazem parte dessa publicação.

Do ponto de vista neuropsicológico, os pacientes do grupo III apresentaram graus diferentes de comprometimento, sendo que dois (pacientes 8 e 12) apresentaram deficiência intelectual. O paciente 12 também apresentou, do ponto de vista comportamental, ansiedade.

Nos outros pacientes do grupo III verificamos que, nos pacientes 10 e 11, não foi possível obter uma quantificação precisa do QI, em função do nível de comprometimento cognitivo global e, no paciente 9, além desse comprometimento, também pela idade.

Os outros segmentos cromossômicos envolvidos nos desequilíbrios dos pacientes do grupo III também podem interferir no desempenho intelectual e foram discutidos no item 5.2.10.2.

Na tabela 15 comparamos e resumimos os achados do desempenho intelectual dos pacientes com pontos de quebra em 18p11.21, da mesma forma que comparamos os mesmos pacientes em relação ao aspecto dismórfico facial similar.

Em relação ao desempenho intelectual, a paciente 6, que do ponto de vista dismorfológico apresenta fenótipo facial similar aos pacientes do grupo I, quando comparada do ponto de vista neuropsicológico, torna-se a paciente mais comprometida tanto do ponto de vista cognitivo, quanto do ponto de vista das habilidades adaptativas, sugerindo que a conformação em anel poderia interferir na expressão dos genes envolvidos com o desempenho cognitivo piorando o quadro.

Já o paciente 12, em que a deleção 18p está relacionada à translocação t(18;21), apresentou avaliação cognitiva e de habilidades adaptativas semelhantes aos outros pacientes

com deleção no ponto de quebra em 18p11.21 (pacientes 2, 3 e 4) como observado na Tabela 15 e na Figura 34.

Da mesma forma, observamos que os pacientes do grupo I com ponto de quebra em 18p11.23 apresentaram um fenótipo dismórfico facial mais suave que os pacientes com ponto de quebra em 18p11.21 (figura 31), do ponto de vista neuropsicológico, observamos que os pacientes com o ponto de quebra mais distantes do centrômero apresentaram melhor desempenho, como já descrito por outros autores na literatura (Tabela 15 e figura 34). Por exemplo, Wester et al. (2006) consideraram que a região entre 18p11.1 e 18p11.21 parece ser crítica na determinação da deficiência intelectual, uma vez que tem sido verificado que pacientes com deleções mais distais a esse ponto de quebra tendem a apresentar desenvolvimento intelectual normal ou deficiência intelectual leve (Babovic-Vuksanovic et al. 2004; Wester et al. 2006; Willoughby et al. 2014).

Dentre os poucos relatos da literatura de avaliação neuropsicológica em pacientes com deleção 18p, destacamos a amostra de 31 pacientes, todos com deleção em 18p11.1, de Sebold et al. (2015). Os autores relataram atraso, tanto nas aquisições do desenvolvimento neuropsicomotor, quanto na aquisição de habilidades adaptativas. Os escores de QI dessa amostra variaram de deficiência leve à normalidade, com a mediana em variação normal de inteligência.

Os achados de Sebold et al. (2015) diferem do perfil cognitivo de pacientes com deleção 18p descrito por outros autores que evidenciaram escores de QI variando em torno de 50 (Thompson et al. 1986; Wester et al. 2006; Turleau 2008), mas são semelhantes aos observados nos pacientes da presente amostra, quando consideramos apenas o grupo I, que também apresenta deleção 18p pura.

Grosso et al. (1999) descreveram uma paciente com deleção 18p11.1 com mutismo seletivo e deficiência intelectual leve, mas na presente amostra não encontramos pacientes com mutismo seletivo.

Zavala et al. (2010) avaliaram pacientes com alterações cromossômicas do cromossomo 18 e síndromes psiquiátricas e encontraram nos pacientes com deleção 18p sintomas de ansiedade, inquietação, ansiedade frente ao desconhecido, dificuldade de concentração e labilidade de humor, mas não encontraram sinais de depressão, mania ou outros sintomas psicóticos, achados semelhantes à presente amostra, como observado na tabela 8.

O relato de Willoughby et al. (2014) confirmou os achados de Zavala et al. (2010), quando avaliaram outro paciente com deleção 18p11.21 que apresentou escores de QI 70 (limítrofe), e que não apresentou discrepâncias entre os domínios verbais e não-verbais, porém com escores limítrofes também para essas avaliações.

5.2.12 Alterações imunológicas

Várias alterações imunológicas com diferentes graus de severidade associada a síndromes genéticas têm sido descritas (Mir et al., 2005,2014). As deficiências de IgA, IgM e IgG foram relatadas em pacientes com deleção 18p, deleção 18q e r(18) desde as primeiras descrições (de Grouchy et al., 1969; Leisti et al., 1979; Taalman et al., 1987; Wester et al., 2006; Browning et al., 2010; Celmeli et al., 2014).

Na presente amostra, as dosagens séricas das imunoglobulinas A, G e M dos 12 pacientes revelaram alterações diversas em 42% dos pacientes. Observamos aumento dos níveis séricos de IgA (pacientes 2 e 8), níveis reduzidos de IgG (paciente 4), níveis reduzidos de IgM (pacientes 4 e 6) e níveis reduzidos de IgA (pacientes 6 e 7) (Tabela 3). A deficiência de IgA foi confirmada no paciente 7 e a suspeita foi levantada na paciente 6, da qual não conseguimos realizar os exames complementares necessários para essa confirmação. Esses achados são condizentes com os encontrados na literatura que referem a presença de alterações imunológicas, principalmente deficiência de alguma classe de imunoglobulina (IgG, IgM e IgA) nos pacientes com deleção 18p (de Grouchy et al., 1969; Browning et al., 2010; Recalcati et al., 2010; Celmeli et al., 2014).

Encontramos apenas um trabalho na literatura com o estudo de produção de anticorpos a antígenos proteicos e polissacarídeos (PS), mas nenhum com a avaliação do sistema complemento nos pacientes com deleção 18p (Browning et al., 2010).

No presente trabalho, dos cinco pacientes que foram testados, dois (40%) apresentaram respostas alteradas, de forma que consideramos que se trata de achado importante para que a indicação da avaliação da produção de anticorpos vacinais seja realizada em todos os pacientes com deleção 18p.

A resposta deficiente a antígenos PS em pacientes com imunoglobulinas séricas e subclasses de IgG normais tem sido descrita como uma síndrome de deficiência anticorpo específica e reconhecida como uma das mais frequentemente observadas em pacientes com mais de dois anos de idade com infecção respiratória de repetição na população em geral (Ming et al., 1996, 2008).

Browning et al. (2010) relataram uma paciente com deleção 18p com deficiência de IgA e de resposta diminuída a antígenos polissacarídeos que apresentava infecção do trato respiratório alto recorrente e infecções genitourinárias que necessitaram de tratamento profilático com antibióticos, sendo que o mesmo ocorreu com o paciente 7 da presente amostra.

Vorechovský et al. (1999), ao estudarem múltiplos casos de deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável em 83 famílias, não encontraram evidência de ligação com o cromossomo 18. Os autores discutem que, frente aos resultados negativos encontrados por eles na busca por um *locus* de susceptibilidade, outras hipóteses para explicar a associação de deficiência de IgA e alterações do cromossomo 18 devem ser levantadas. Dentre essas hipóteses, os autores sugerem que a produção de IgA pode ser influenciada por vias metabólicas cruciais para o crescimento e desenvolvimento humano e que a inibição do desenvolvimento, presente nesses pacientes, poderia levar à deficiência de IgA. Essa opinião é corroborada por relatos de pacientes com várias síndromes com retardo de desenvolvimento e defeitos na imunidade humoral (Ming et al., 1996).

Vorechovský et al. (1999) também relatam que muitos indivíduos com deficiência de IgA incluídos no estudo de ligação realizado por eles não apresentavam doença genética e argumentam que talvez a frequência de deficiência de IgA em pacientes com deleção 18p tenha sido sobrestimada, mesmo com a evidência inequívoca na literatura de deficiência de IgA em muitos indivíduos com alterações no cromossomo 18. Os primeiros casos de alterações no cromossomo 18 com deficiência de IgA foram descritos logo após a aplicação clínica da análise citogenética, chamando especialmente a atenção para a associação e possivelmente criando um viés de excesso em relatar os níveis séricos de imunoglobulinas nesses pacientes.

Há outros genes na região 18p com suspeita de envolvimento com a imunidade como o gene *LPIN2* (localizado em 18p11.31) e o gene *MC5R* (localizado em 18p11.21).

Mutações em homozigose no gene *LPIN2* causam a síndrome de Majeed que cursa com osteomielite multifocal crônica recorrente associada à anemia diseritropoiética congênita e o gene *MC5R* (localizado em 18p11.21) cujo produto proteico são receptores de melancortina. Esses receptores de melancortina estão envolvidos com muitas funções fisiológicas incluindo pigmentação, homeostase, inflamação, modulação imune, esteroidogênese e controle de temperatura (Recalcati et al., 2010).

A autoimunidade é a alteração mais frequente em pacientes com deficiência seletiva de IgA, e pode estar relacionada com a falta de exclusão antigênica geralmente exercida pela IgA nas mucosas, permitindo a penetração de antígenos e estimulando a imunidade.

A incidência de doenças autoimunes em pacientes com alterações cromossômicas no cromossomo 18 [del18p, del18q e r(18)] parece ser maior que na população em geral e estudos de ligação sugeriram que a região 18q21 (coordenadas: 43,546,004-61,649,020) poderia ter um *locus* de susceptibilidade para doenças autoimunes como o diabetes mellitus insulino dependente tipo 1 (IDDM6) (Merriman et al.1997; Dacou-Voutetakis et al.1999; Cody et al., 2009). Dostal et al. (2007) mapearam um *locus* de susceptibilidade para deficiência de IgA em 18q22.3-q23 contrariando os achados de Vorechovský et al. (1999).

Doenças autoimunes como o hipotireoidismo, diabetes tipo 1, hipoparatiroidismo, artrite reumatóide juvenil, diabetes mellitus, psoríase, vitiligo, alopecia, lúpus eritematoso, doença de Sjogrens e anemia perniciosa foram descritas em pacientes com deleção 18p (Rosen et al., 2004; Schaub et al., 2005; Cody et al., 2009b).

Sebold et al. (2015), em uma amostra de 31 pacientes com deleção de todo o braço curto do cromossomo 18, encontraram doença autoimune (doença de Graves, psoríase e lúpus eritematoso) em 10% e deficiência de imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM) em 13% dos pacientes.

Hasi-Zogaj et al. (2015) em estudo com 91 pacientes com diferentes pontos de quebra em 18p, encontraram artrite reumatoide (3/91), sendo que um desses pacientes apresentou artrite reumatoide associada a doença celíaca e alopecia (1/91), doença celíaca (2/91), alopecia (2/91), psoríase (1/91), Sjogrens (1/91), lúpus (1/91), vitiligo (2/91) e hipotireoidismo autoimune, manifestados por doença de Graves (1/91), bócio multinodular (1/91) e hipotireoidismo (3/91).

Dentre os 12 pacientes da presente amostra, seis (50%) apresentaram hipotireoidismo e dois outros apresentaram suspeita laboratorial de hipotireoidismo subclínico (em monitoramento) como manifestação de hipotireoidismo autoimune, mas não encontramos outras doenças autoimunes como descritas nos pacientes com deleção 18p.

Nesse estudo, apenas cinco pacientes apresentam hemizigose do gene *PTPN2* (pacientes 2, 3, 4, 6 e 12), sendo que quatro (paciente 2, 3, 4 e 6) apresentaram hipotireoidismo e um (paciente 12) apresentou hipotireoidismo subclínico, sugerindo risco para hipotireoidismo.

Curiosamente, a região considerada crítica para doença autoimune (coordenadas genômicas: 12,316,423-12,317,830) no braço curto do cromossomo 18 não inclui o gene *PTPN2* (*Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*), localizado em 18p11.21 (coordenadas genômicas:12,785,476-12,884,336).

Mutações no gene *PTPN2* estão relacionadas à doença inflamatória intestinal, mas colite ulcerativa e doença de Crohn não foram relatadas em pacientes com deleção 18p (Hassan et al., 2008; Glas et al., 2012; Zhang et al., 2014). Por outro lado, o gene *PTPN2* está associado à artrite reumatoide e diabetes mellitus insulino-dependente, ambas relatadas em pacientes com deleção 18p (Czakó et al., 2002; Rosen et al., 2004; Todd et al., 2007; Recalcati et al., 2010; Okada et al., 2012).

Frente a esses achados, conclui-se que, embora a deficiência imunoglobulinas séricas (IgA, IgM e IgG) e diminuição de produção de anticorpos a antígenos proteicos e polissacarídeos não sejam encontradas em todos os pacientes com alterações cromossômicas do cromossomo 18, estes pacientes deveriam ser avaliados quanto a alterações imunológicas e doenças autoimunes. Além disso, mais estudos devem ser realizados para definir melhor a correlação genótipo-fenótipo para essas alterações e os achados do presente estudo mostram a importância de se avaliar o sistema imunológico de pacientes com deleção 18p.

5.2.13 Recomendações para a avaliação e seguimento clínico de pacientes com deleção 18p

As recomendações foram realizadas de acordo com buscas ativas nas bases de dados primárias MEDLINE e SciELO, utilizando-se termos descritivos (MeSH terms) para a síndrome da deleção 18p. Acreditamos que estas recomendações tenham nível de evidência C, por serem baseadas na avaliação clínica padronizada e detalhada de uma série de casos de pacientes com deleção 18p, revisão da literatura e consenso de especialistas (Wilson et al., 2000; Ebell et al., 2004; Firth & Hurst, 2005).

Vários aspectos clínicos que embasaram as recomendações foram apresentados durante a discussão dos pacientes.

No entanto, alguns aspectos merecem considerações adicionais, como por exemplo, em relação à compilação das descrições clínicas, verificamos que a maioria das encontradas na literatura não apresenta uniformidade de método de forma que acreditamos que o protocolo e as tabelas clínicas apresentadas neste estudo possam auxiliar o médico geneticista clínico na descrição mais padronizada dos pacientes.

Do ponto de vista citogenético, devemos considerar que, embora o diagnóstico citogenético por bandeamento G defina o diagnóstico da síndrome na maioria dos casos, o *array* torna-se importante para a melhor determinação dos pontos de quebra e definição dos segmentos cromossômicos e genes envolvidos, melhorando a correlação genético-clínica e explicando aspectos incomuns encontrados em pacientes com alterações citogenômicas complexas.

Consideramos que a realização do *array* dentro do Sistema Único de Saúde brasileiro ainda é restrita a poucas instituições, geralmente dentro de protocolo de pesquisa. Porém, em alguns países, o *array* já é considerado como o primeiro exame para o diagnóstico de desequilíbrios cromossômicos (Miller et al., 2010; South et al., 2013). Outro aspecto importante é a realização dos laudos dos *arrays*, que devem ser elaborados de forma detalhada, específica e clara, necessitando de profissionais especializados para a realização dos mesmos, uma vez que a interpretação desses nem sempre é fácil.

5.2.14 Limitações do trabalho

O presente trabalho apresentou algumas limitações como, por exemplo, o pequeno número de pacientes da amostra, a grande variabilidade dos desequilíbrios encontrados necessitando de divisão em grupos para a realização da correlação genótipo fenótipo, a grande quantidade de avaliações clínicas e laboratoriais propostas, que diminuiu a adesão das famílias ao protocolo e a falta da aplicação de interrogatório para avaliação do espectro autista e dos aspectos ambientais e socioeconômicos das famílias.

5.3 Considerações finais

O estudo de pacientes com síndromes cromossômicas, devido à grande variabilidade das manifestações apresentadas, ainda constitui um grande desafio para os médicos geneticistas clínicos, tanto do ponto de vista de diagnóstico quanto da avaliação clínica e do seguimento do paciente.

O estudo genômico dos pacientes com anormalidade cromossômica tem revolucionado o diagnóstico, o seguimento e o tratamento desses pacientes. As avaliações clínica e citogenômica detalhadas de pacientes com alterações cromossômicas estruturais por técnicas de *array* podem fornecer pistas para detectar os genes envolvidos com as manifestações clínicas e revelar regiões cromossômicas susceptíveis a quebras. Estes dados podem ser a base do entendimento da doença e de possíveis estratégias de tratamento.

Desta forma, para os indivíduos nascidos agora, podemos antecipar algumas alterações clínicas e proporcionar tratamento precoce resultando em melhor qualidade de vida. Outro aspecto importante é a necessidade de informação para os pais ou responsáveis sobre a evolução clínica, expectativa de vida dos pacientes, assim como informação do que se pode esperar do ponto de vista do desempenho intelectual e comportamental, sendo esses aspectos muito questionados por pais de pacientes com anormalidades cromossômicas.

Levando em conta essas observações, sugerimos algumas recomendações para o seguimento de pacientes com deleção 18p, as quais estão descritas no item 4.8. Sendo recomendações, devem ser reavaliadas constantemente, pois novas descobertas do ponto de vista da correlação genótipo-fenótipo são esperadas no futuro, principalmente do ponto de vista terapêutico.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, uma amostra de 12 pacientes com deleção 18p foi estudada do ponto de vista clínico, neuropsicológico, imunológico e citogenômico como proposto inicialmente.

O protocolo clínico para a avaliação dos pacientes com deleção 18p, que pode ser adaptado para pacientes com outras anormalidades cromossômicas, permitiu a investigação clínica detalhada e a elaboração de recomendações para o acompanhamento médico e neuropsicológico dos pacientes com deleção 18p.

O estudo citogenômico foi realizado em todos os pacientes da amostra revelando grande variação de alterações cromossômicas, tanto herdadas quanto *de novo*, e permitiu a melhor definição dos pontos de quebra das anormalidades cromossômicas apresentadas.

Os pontos de quebra encontrados no braço curto do cromossomo 18 da presente amostra foram diferentes do descrito como mais frequente na literatura.

Além disso, observamos dois casos de transmissão paterna, sendo que na literatura, com aproximadamente 300 casos descritos, apenas dois casos assim foram relatados.

A avaliação clínica dos pacientes com deleção 18p pura (grupo I) foi consistente com os achados clínicos descritos na literatura e pudemos observar um fenótipo facial sugestivo da síndrome da deleção 18p. Além disso, observamos nos pacientes do grupo I um fenótipo facial mais suave quando os pontos de quebra eram mais distais em relação ao centrômero.

A avaliação clínica dos pacientes com r(18) mostrou que os achados clínicos dependem dos segmentos cromossômicos deletados do braço curto e do braço longo.

Nos pacientes do grupo III a avaliação clínica e citogenômica mostrou a importância da metodologia do trabalho revelando que os segmentos duplicados influenciaram significativamente o fenótipo, diferentemente do conceito clínico corrente de que as duplicações cromossômicas têm menor efeito no fenótipo do que as deleções.

Do ponto de vista neuropsicológico, os pacientes com deleção 18p apresentaram nível intelectual com grande variabilidade. Dentre os quatro pacientes com deleção 18p pura (Grupo I), dois apresentaram desempenho em nível médio ou variação normal da inteligência e dois apresentaram deficiência intelectual. Os índices de maior comprometimento foram evidenciados nos pacientes do grupo II, ou seja, com r(18). Nos do grupo III, o comprometimento variou de grave a desempenho intelectual na faixa da variação normal da inteligência. Quanto ao desenvolvimento das habilidades adaptativas, os maiores prejuízos em

toda a amostra envolveram os domínios de atividades de vida diária e comunicação, enquanto as habilidades motoras e socialização mostraram-se relativamente mais preservadas.

As alterações imunológicas encontradas em 42% dos pacientes do presente estudo mostraram a importância de se avaliar o sistema imunológico de pacientes com deleção 18p, não só as dosagens das imunoglobulinas séricas, mas também a investigação mais detalhada incluindo a avaliação da resposta aos antígenos proteicos e polissacarídeos pós-vacinais.

A definição dos pontos de quebra permitiu uma melhor correlação genótipo-fenótipo dos pacientes confirmando a importância do estudo citogenômico em pacientes com alterações cromossômicas, principalmente nos caso de alterações cromossômicas envolvendo mais de um segmento cromossômico.

Finalmente, o trabalho permitiu a sugestão de recomendações para o seguimento médico e neuropsicológico de pacientes com deleção 18p, de modo a propiciar um melhor atendimento aos pacientes e familiares.

7. ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do comitê de ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 25-03-2010 10:47:41
Página 1/4
Id = 4554

São Paulo, 30 de Outubro de 2009
CEP 1403/09

Ilmo(s). Sr(a).

Pesquisador(a) VERA DE FREITAS AYRES MELONI
Disciplina/Departamento Genética da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:

'Avaliação Genético-Clinica e Citogenético-Molecular de Pacientes com Deleção do Braço Curto do Cromossomo 18 e com Anel do Cromossomo 18.'

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião do dia 30/10/2009, ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa acima referenciado. Ressaltamos ainda que, o projeto NÃO PODERÁ SER INICIADO até que se obtenha o parecer favorável da CONEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto: Deleção do Braço Curto do cromossomo 18: Avaliação Clínica e Citogenômica

O objetivo deste estudo é avaliar pacientes com alterações envolvendo o braço curto do cromossomo 18 para melhorar o diagnóstico clínico e genético-molecular oferecendo aos pacientes e às famílias melhor orientação para o seguimento clínico e aconselhamento genético.

Para isso os pacientes serão avaliados segundo um protocolo específico que incluirá anamnese, antecedentes familiares, antecedentes gestacionais, exame físico geral e morfológico, exames laboratoriais, estudos radiológicos e fotografias clínicas.

Para a avaliação clínica, os pacientes serão examinados e acompanhados pelo médico geneticista participante do projeto. Os pacientes serão fotografados para melhor caracterização do fenótipo e o material será utilizado unicamente para fins da caracterização diagnóstica e publicação científica.

Serão colhidos 10 mL de sangue da veia do antebraço para o estudo citogenômico, uma única vez, com material estéril e descartável. Não é necessário jejum. Os desconfortos decorrentes da punção podem ser dor e vermelhidão local, considerados sem complicação na clínica diária.

Os pais e irmãos também poderão fazer parte do estudo para o estudo da origem do cromossomo alterado.

Não haverá qualquer custo ou despesa para o paciente ou seu(s) responsável(s) e não haverá nenhum tipo de compensação financeira referente à sua participação e resultados obtidos poderão ser consultados a qualquer momento.

Os pesquisadores envolvidos comprometem-se a proteger a privacidade dos participantes e a utilizar os dados clínicos, laboratoriais e a documentação fotográfica somente para pesquisa e publicação científica.

Em qualquer etapa do estudo, os profissionais responsáveis estarão à sua disposição para o esclarecimento de eventuais dúvidas.

É garantida ao participante a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Os pesquisadores garantem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa científica.

Os principais investigadores são a Dr^a Vera Freitas de Ayres Meloni e a Dr^a Maria Isabel Melaragno, que podem ser contatadas por e-mail (vera.meloni@gmail.com e melaragno.morf@epm.br), pelos telefones 55764260/4264, na Disciplina de Genética, situada à Rua Botucatu, n^o 740, CEP 04023-900, São Paulo, Capital ou no Centro de Genética Médica da UNIFESP-EPM, situado à rua Coronel Lisboa, n^o 966, CEP 04020-041. Seja qual for a consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Botucatu, 572- 1^o andar cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162; e-mail: cepunifesp@epm.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo essa investigação clínica.

Eu discuti com a Dra Vera de Freitas Ayres Meloni sobre a minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim: os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus riscos e desconfortos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Além disso, ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que eu tenho garantia do acesso hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que a paciente possa ter adquirido no atendimento neste serviço.

Nome do (a) paciente: _____

Nome do representante legal do paciente: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura do (a) paciente ou nome e assinatura do representante legal

Assinatura da testemunha

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO 3 - Protocolo clínico**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E CITOGENÔMICA DE PACIENTES COM DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 18.**

Data do atendimento		CGM /AG	
Nascimento	Idade	RG HSP	
Nome		Ocupação	Sexo
Natural			Esc
Pai	Idade	Ocupação	Esc
Natural			
Mãe	Idade		Esc
Natural	Ocupação		
Endereço	Cidade/UF	Telefone	
CEP			
Outras informações			

ENCAMINHAMENTO:**H.P.M.A/I.S.D.A.:****ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS:**

Gesta		Gestação	S	N	Pré-natal	
Para		planejada			Nº de consultas	
AE		desejada			mês da primeira consulta	
AP		ultra-som			início dos movimentos fetais	
Laqueadura		DUM			vigor e frequência	

INTERCORRÊNCIAS DURANTE A GESTAÇÃO:

PERÍODO NEONATAL

Parto		Apresentação		Cronologia		IG	sem
Espontâneo		Cefálica		Termo		PN	g
Cesárea		Pélvica		Pré-termo		CN	cm
Fórceps		Córmica		Pós-termo		PC	cm
		Outras				APGAR	

Demorou para chorar? ()S ()N

Apresentou cianose? ()S ()N

INTERCORRÊNCIAS NEONATAIS

(condições de nascimento, problemas no berçário, condições de alta, amamentação, etc)

Triagem Neonatal: FAL

T4

Outras

ANTECEDENTES MÓRBIDOS (Internações, Cirurgias, Doenças Crônicas):**CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO:**

Sorriso social		Sustentação da cabeça		Sentou com apoio	
Sentou sem apoio		Engatinhou		Andou sem apoio	
Primeiras palavras		Controle de Esfíncteres			

Comportamento e DNPM atual / Escolaridade

ACOMPANHAMENTO ESPECIALIZADO (FONO, T.O., FISIO, ESCOLA ESPECIAL, ETC):

ANTECEDENTES FAMILIARES: CONSANGUINIDADE: () SIM () NÃO

Irmandade do Propósito (A):

Gestação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nv,nm,ae,ap										
Sexo: m,f,i										
Apresentação										
parto:ces,esp,fo										
termo/prét/póst										
Peso nasc										
Comprimento nasc										
Data										

HEREDOGRAMA:**EXAME FÍSICO GERAL:****ANTROPOMETRIA:**

Dado	Valor	Perc.	Dado	Valor	Perc.	Dado	Valor	Perc.
Peso			Font.			PT		
Est.			DAT			DIM		
Env.			DT			Esterno		
DPP			I.Cef			Mão D		
DCC			DICE			Mão E		
SS/SI			DICI			Dedo D		
PC		id	DIP			Dedo E		
		est	Orelha D			Pé D		
			Orelha E			Pé E		

Sinais da deleção 18p	Presente	Ausente	Comentário
Baixo peso ao nascer			
Baixa estatura			
Deficiência intelectual			
Atraso desproporcional na linguagem			
Lentidão			
Autismo			
Hipotonia muscular			
Convulsões			
Malformação SNC			
Holoprosencefalia			
Artrite reumatóide			
Nefropatia			
Hipo ou ausência de IgA			
Tendência à infecção			
Microcefalia			
Fáscies larga			
Fáscies hipoexpressiva			
Ptose			
Hipertelorismo			
Estrabismo			
Epicanto			
Inclinação para baixo (1) ou para cima (2) da fenda palpebral			
Nariz largo e achatado			
Macrostomia			
Eversão do lábio inferior			
Inclinação para baixo do canto da boca			
Palato alto e estreito			
Atraso da erupção dentária/dente irregular			
Cáries dentárias			
Micrognatia/Retrognatia			
Orelhas grandes e com pavilhão com rotação anterior			
Orelhas com pavilhão simplificado			
Rotação posterior das orelhas			
Pescoço curto e largo			
Malformação de Tórax			
Pés escavatum			
Hipertelorismo mamário			
Escoliose e/ou cifose			
Coxa vara			
Polegares de implantação baixa			
Genital masculino hipoplásico			
Lábios menores relativamente grandes			
Mãos largas e dedos curtos			
Clinodactilia do 5º dedo			



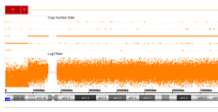

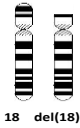
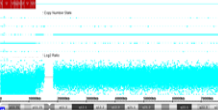
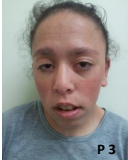
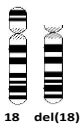
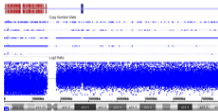

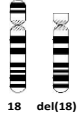
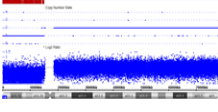

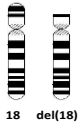
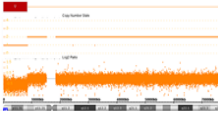
EXAMES COMPLEMENTARES	Sim	Não	Resultado
Cariótipo			
FISH			
<i>array</i>			
Radiografia do esqueleto			
RM de crânio			
RM de hipófise			
Ecocardiograma			
US renal e de abdomen			
Avaliação endocrinológica			
Avaliação imunológica			
Avaliação neuropsicológica			
Documentação fotográfica			

Médico Responsável:

CRM:

ANEXO 4 - Quadro 2



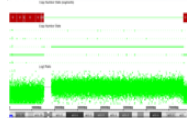
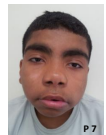

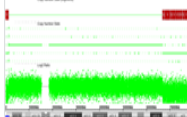

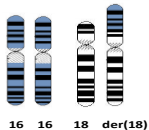
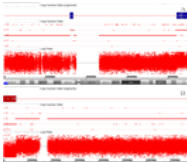
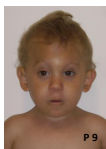
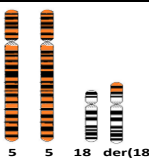
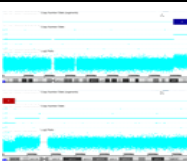

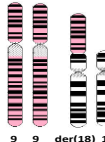
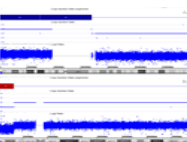


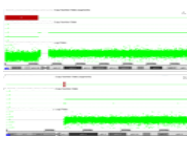
Resumo das características clínicas, idiogramas dos cromossomos envolvidos e principais genes deletados nos pacientes do Grupo I

Paciente	Principais características clínicas dos pacientes	Idiogramas	Ponto de quebra	array	Genes
	P1: Feminino, 3 anos, ADNPM, hipotonia axial e discreta hipertonia axial, fâscies arredondada, hipertelorismo ocular, hemangioma plano na fronte, pinçamento frontal, fenda palpebral oblíqua com inclinação superior, narinas antevertidas, comissura labial com cantos voltados para baixo, palato alto, pescoço curto e ânus anteriorizado.		18p11.23		CETN1 TYMS YES1 ADCYAP1
	P2: Feminino, 9 anos, deficiência intelectual, hipotonia muscular, fâscies arredondada, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, sobrancelhas ralas, fosseta pré-auricular à direita, pectus carinatum, hiperqueratose pilar, <i>ulerythema ophryogenes</i> e hipotireoidismo.		18p11.21		TGIF1 LAMA1 GNAL MYOM1 PTPN2
	P3: Feminino, 18 anos, deficiência intelectual, hipotonia muscular, baixa estatura proporcionada, microcefalia, ptose palpebral, hipertelorismo, comissura labial com cantos voltados para baixo, gengivas hipertrofiadas, dentes de implantação anômala, cáries, queratose pilar extensa, escoliose e hipotireoidismo.		18p11.21		TGIF1 LAMA1 GNAL MYOM1 PTPN2
	P4: Masculino, 23 anos, QI com desempenho em VNI, baixa estatura proporcionada, hipertelorismo ocular, estrabismo divergente, orelhas grandes orelhas com pavilhão anteriorizado e hélice simplificada, narinas antevertidas, micropênis, hipotireoidismo, hipófise ectópica e deficiência de hormônio de crescimento.		18p11.21		TGIF1 LAMA1 GNAL PTPN2
	P5: Masculino, 24 anos, QI normal com desempenho médio inferior, dificuldade de aquisição de linguagem, macrocefalia, hipertelorismo ocular, orelhas grandes, queratose pilar e <i>ulerythema ophryogenes</i> .		18p11.23		CETN1 TYMS YES1 ADCYAP1

Na coluna à extrema direita estão anotados em vermelho alguns dos genes deletados. ADNPM: atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; VNI: variação normal da inteligência

ANEXO 5 - Quadro 3

Resumo das características clínicas, idiogramas dos cromossomos envolvidos e principais genes deletados e duplicados nos pacientes dos Grupos II e III.

Paciente	Principais características clínicas dos pacientes	Idiogramas	Pontos de quebra	array	Genes
	P6: Feminino, 15 anos, ADNPM, atraso da aquisição de linguagem, deficiência intelectual, baixa estatura proporcionada, hipertelorismo ocular, estrabismo divergente, macrostomia, comissura labial com cantos voltados para baixo, escoliose, valva aórtica espessada, deficiência de IgA, convulsões e hepatite crônica.		18p11.21 18q23		TGIF1 LAMA1 GNAL PTPN2
	P7: Masculino, 13 anos, deficiência intelectual com QI não quantificável, baixa estatura proporcionada, microcefalia, fâscies larga, hipertelorismo ocular, macrostomia, fenda palatina posterior e úvula bífida, pênis pequeno, hipospadia, hipotireoidismo, hipercolesterolemia e imunodeficiência.		18p11.32 18q22.1		THOC1 CETN1 CYB5A
	P8: Masculino, 32 anos, deficiência intelectual, baixa estatura proporcionada, ptose palpebral, estrabismo convergente, orelhas grandes, fenda palatina submucosa posterior, pênis pequeno, hipospádia, hérnia inguinal à esquerda, hipercolesterolemia e esteatose hepática.		16q23.3 18p11.31		YES ADCYAP1 IRF8 CYBA FOXF1
	P9: Masculino, 20 meses, atraso cognitivo, microsomia, trigonocefalia, microcefalia, estrabismo divergente, dismorfias faciais menores, genu valgo, sulco halucal, pele seca e áspera, unhas hipoplásicas, bloqueio incompleto de ramo direito e rarefação do epitélio pigmentar retiniano em ambos os olhos.		5q35.3 19p11.32		TGIF1 NSD1 RARS MSX2
	P10: Masculino, 18 anos e P11: Feminino, 6 anos, deficiência intelectual com QI não quantificável, baixa estatura proporcionada, hipertelorismo ocular, inclinação oblíqua para baixo das fendas palpebrais, ptose palpebral orelhas grandes, macrostomia, lábios grossos, comissura labial com cantos voltados para baixo e hipoplasia ungueal em ambos os pés.		9q13.1 18p11.31		TGIF1 MYOM1 FREMI PAX5 SMARCA2
	P12: Masculino, 21 anos, deficiência intelectual, hipotonia, baixa estatura proporcionada, sialorréia, ptose palpebral, macrostomia, lábios grossos, comissura labial com cantos voltados para baixo, orelhas grandes, cifose torácica e unhas dos pés hiperconvexas e hipoplásicas em 5º pododáctilos.		18p11.21 21q11.2		LAMA1 GNAL PTPN2

Na coluna à extrema direita estão anotados em vermelho alguns dos genes deletados e em azul alguns dos genes duplicados. ADNPM: atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.1 Referências bibliográficas

Aldinger KA, Mosca SJ, Tétéreault M, Dempsey JC, Ishak GE, Hartley T, et al. Mutations in LAMA1 cause cerebellar dysplasia and cysts with and without retinal dystrophy. *Am J Hum Genet* 95:227-234 (2014).

Anderson C, Crimmins S, Wilson JA, Korbel GA, Ploegh HL, Wilson SM. Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J Neurochem* 95: 724-731 (2005).

Aritaki S, Takagi A, Someya H, Jun L. Growth hormone neurosecretory dysfunction associated with ring chromosome 18. *Act Paediat Jpn* 38:544-548 (1996).

Babovic-Vuksanovic D, Jenkins SC, Ensenaer R, Newman DC, Jalal SM. Subtelomeric deletion of 18p in an adult with paranoid schizophrenia and mental retardation. *Am J Med Genet A* 124A:318-322 (2004).

Balci S, Zschocke J, Kotzot D, Ergun MA, Spreiz A. Formation of a familial ring chromosome 18 investigated by SNP-array analysis. *Am J Med Genet* 164:1854-1856 (2014).

Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG. Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12:2153-2165 (2003).

Bayes A, van de Lagemaat LN, Collins MO, Croning MD, Whittle IR, Choudhary JS, et al. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat Neurosci* 14:19-21 (2011).

Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Weeks DE, Detera-Wadleigh S, Nurnberger JI Jr, Gershon ES. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5918-5921 (1994).

Betancur C, Sakurai T, Buxbaum JD. *Trends Neurosci* 32:402-412 (2009).

Brenk CH, Prott EC, Trost D, Hoischen A, Walldorf C, Radlwimmer B, et al. Towards mapping phenotypical traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent in situ hybridisation. *Eur J Med Genet* 15:35-44 (2007).

Browning MJ. Specific polysaccharide antibody deficiency in chromosome 18p deletion syndrome and immunoglobulin A deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20:263-6 (2010).

Bushby KDM, Cole T, Matthews JNS, Goodship JA. Centiles for adults head circumference. *Arch Dis Child* 67:1286-1287 (1992).

Caba L, Rusu C, Plăiașu 5th, Gug G, Grănescu M, Bujoran C, Ochiană D, Voloșciuc M, Popescu R, Braha E, Pânzaru M, Butnariu L, Sireteanu A, Covic M, Gorduza E. Ring autosomes: some unexpected findings. *Balkan J Med Genet* 15:35-46 (2012).

- Carter E, Heard P, Hasi M, Soileau B, Sebold C, Hale DE, et al. Ring 18 molecular assessment and clinical consequences. *Am J Med Genet A* 167A:54-63 (2015).
- Carvalho CA, Carvalho AVE, Kiss A, Paskulin G, Götze FM. Ceratose pilar e ulerythema ophryogenes em mulher com monossomia do braço curto do cromosomo 18. *An Bra Dermatol* 86:42-45 (2011).
- Carvalho AF, da Silva Bellucco FT, Kulikowski LD, Toralles MB, Melaragno MI: Partial 5p monosomy or trisomy in 11 patients from a family with a t(5;15)(p13.3;p12) translocation. *Hum Genet* 124:387-392 (2008).
- Celmeli F, Turkkahraman D, Cetin Z, Mihci E, Yegin O. Selective IgM deficiency in a boy with ring chromosome 18. *J Investig Allergol Clin Immunol* 24:442-444 (2014).
- Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 35:611-621 (2011).
- Christensen KR, Friedrich U, Jacobsen P, Jensen K, Nielsen J, Tsuboi T. Ring chromosome 18 in mother and daughter. *J Ment Defic Res* 14:49-67 (1970).
- Cody JD, Ghidoni PD, DuPont BR, Hale DE, Hilsenbeck SG, Stratton RF, Hoffman DS, Muller S, Schaub RL, Leach RJ, Kaye CI. Congenital anomalies and anthropometry of 42 individuals with deletions of chromosome 18q. *Am J Med Genet* 85:455-462 (1999).
- Cody JD, Carter EM, Sebold C, Heard PL, Hale DE. A gene dosage map of Chromosome 18: a map with clinical utility. *Genet Med* 11:778-782 (2009a).
- Cody JD, Heard PL, Crandall AC, Carter EM, Li J, Hardies LJ, Lancaster J, Perry B, Stratton RF, Sebold C, Schaub RL, Soileau B, Hill A, Hasi M, Fox PT, Hale DE. Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q- phenotypes. *Am J Med Genet A* 149A:1421-1430 (2009b).
- Cody JD, Hale DE. Making chromosome abnormalities treatable conditions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 169C:209-215 (2015).
- Corradi JP, Ravyn V, Robbins AK, Hagan KW, Peters MF, Bostwick R, et al. Alternative transcripts and evidence of imprinting of GNAL on 18p11.2. *Mol Psychiatry* 10:1017-1025 (2005).
- Cruz MBZ. WISC III: Escala de Inteligência Wechsler para crianças: Manual. Aval psicol. Porto Alegre (2005).
- Czakó M, Riegel M, Morava E, Schinzel A, Kosztolányi G. Patient with rheumatoid arthritis and MCA/MR syndrome due to unbalanced der(18) transmission of a paternal translocation t(18;20)(p111;p111). *Am J Med Genet* 108:226-228 (2002).
- Dacou-Voutetakis C, Sertedaki A, Maniatis-Christidis M, Sarri C, Karadima G, Petersen MB, Xaidara A, Kanariou M, Nicolaidou P. Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) and

autoimmune thyroiditis in a boy with a ring chromosome 18: additional evidence of autoimmunity or IDDM gene(s) on chromosome 18. *J Med Genet* 36:156-158 (1999).

de Grouchy J, Lamy M, Thieffry S, Arthuis M, Salmon CH. Dysmorphie complexe avec oligophrenie: deletion des bras courts d'un chromosome 17-18. *C R Acad Sci* 258:1028 (1963).

de Grouchy J, Royer P, Salmon C, Lamy M. Partial deletion of the long arms of chromosome 18. *Pathol Biol* 12:579-582 (1964).

de Grouchy J, Danon F. A study of IgA, G and M in five cases of partial deletion of chromosome 18. *Ann Genet* 12:99 (1969).

Dharmadhikari AV, Gambin T, Szafranski P, Cao W, Probst FJ, Jin W, et al. Molecular and clinical analyses of 16q24.1 duplications involving FOXF1 identify an evolutionarily unstable large minisatellite. *BMC Med Genet* 15:128-141 (2014).

Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, et al. Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet* 42:313-321 (2010).

Dolek-Cetinkaya D, Demirpence M, Gorgel A, Salgur F, Bahceci M. A Rare Association of Monosomy 18p Syndrome and Polyglandular Autoimmune Syndrome Type IIIA. *Balkan J Med Genet* 16:81-84 (2013).

Dostal A, Linnankivi T, Somer M, Kähkönen M, Litzman J, Tienari P. Mapping susceptibility gene locus for IgA deficiency at del(18)(q22.3-q23); report of familial cryptic chromosome t(18q;10p) translocations. *Int J Immunogenet* 34:143-147 (2007).

Drachler ML, Marshall T, de Carvalho-Leite JC. A continuous-scale measure of child development for population-based epidemiological surveys: a preliminary study using Item Response Theory for the Denver Test. *Paediatr Perinat Epidemiol* 21:138-153 (2007).

Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, et al. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 24:43-51 (2004).

Ebell MH, Siwek J, Weiss BD, Woolf SH, Susman J, Ewigman B, Bowman M. Strength of Recommendation Taxonomy (SORT): a patient-centered approach to grading evidence in the medical literature. *J Am Board Fam Pract* 17:59-67 (2004).

Esposito F, Addor MC, Humm AM, Vingerhoets F, Wider C. GNAL deletion as a probable cause of dystonia in a patient with the 18p- syndrome. *Parkinsonism Relat Dis* 20:351-352 (2014).

Feenstra I, Vissers LE, Pennings RJ, Nillesen W, Pfundt R, Kunst HP, et al. Disruption of teashirt zinc finger homeobox 1 is associated with congenital aural atresia in humans. *Am J Hum Genet* 89:813-819 (2011).

- Fernandes Lopes RM, Wendt GW, Rathke SM, Senden DA, da Silva RBF, Argimon IL. Reflexões teóricas e práticas sobre a interpretação da escala de inteligências Wechsler para adultos. *Act Colom Psi* 15:109-118 (2012).
- Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, et al. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet* 45:88-92 (2013).
- Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Harada N, et al. A unique case of de novo 5q33.3–q34 triplication with uniparental isodisomy of 5q34–qter. *Am J Med Genet* 161:1904–1909 (2013).
- Genest P, Leclerc R, Auger C. Ring chromosome and partial translocation in the same cell. *Lancet* 1:1426 (1963).
- Glas J, Wagner J, Seiderer J, Olszak T, Wetzke M, Beigel F, et al. PTPN2 gene variants are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis supporting a common genetic disease background. *PLoS One* 7:e33682-e33692 (2012).
- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25:205-208 (2000).
- Gropp A, Jussen A, Ofteringer K. Multiple Congenital Anomalies Associated with a Partially Ring-Shaped Chromosome Probably Derived from Chromosome No. 18 in Man. *Nature* 202:829-830 (1964).
- Grosso S, Cioni M, Pucci L, Morgese G, Balestri P. Selective mutism, speech delay, dysmorphisms, and deletion of the short arm of chromosome 18: a distinct entity? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:830-831 (1999).
- Guilherme RS, Meloni VFA, Kim CA, Pellegrino R, Takeno SS, Spinner NB, et al. Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Med Gen* 12:171-177 (2011).
- Guilherme RS, Meloni VA, Perez A, Pilla A, de Ramos M, Dantas A, et al. Duplication 9p and their implication to phenotype. *BMC Med Genet* 15:142-148 (2014).
- Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* 365:127-138 (2011).
- Hasi-Zogaj M, Sebold C, Heard P, Carter E, Soileau B, Hill A, et al. A review of 18p deletions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 169:251-264 (2015).
- Hassan MJ, Chishti MS, Jamal SM, Tariq M, Ahmad W. A syndromic form of autosomal recessive congenital microcephaly (Jawad syndrome) maps to chromosome 18p11.22-q11.2. *Hum Genet* 123:77-82 (2008).
- Heard PL, Carter EM, Crandall AC, Sebold C, Hale DE, Cody JD. High resolution genomic analysis of 18q- using oligo-microarray comparative genomic hybridization (aCGH). *Am J Med Genet A* 149A:1431-1437 (2009).

- Jain N, Reitnauer PJ, Rao KW, Aylsworth AS, Calikoglu AS. Autoimmune polyendocrinopathy associated with ring chromosome 18. *J Pediatr Endocrinol Metab* 24:847-850 (2011).
- Kauvar EF, Hu P, Pineda-Alvarez DE, Solomon BD, Dutra A, Pak E, et al. Minimal evidence for a direct involvement of twisted gastrulation homolog 1 (TWSG1) gene in human holoprosencephaly. *Mol Genet Metabol* 102:470-480 (2011).
- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M. GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136:669-678 (1997).
- Koç A, Kan D, Karaer K, Ergün MA, Karaoğuz MY, Gücüyener K, Hinreiner S, Liehr T, Perçin EF. An unexpected finding in a child with neurological problems: mosaic ring chromosome 18. *Eur J Ped* 167:655-659 (2008).
- Leisti J, Leisti S, Perheentupa J, Savilahti E, Aula P. Absence of IgA and growth hormone deficiency associated with short arm deletion of chromosome 18. *Arch Dis Child* 48:320-322 (1973).
- Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, et al. Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2. *Hum Mol Genet* 24:659-669 (2015).
- Liakou AI, Esteves de Carvalho AV, Nazarenko LP. Trias of keratosis pilaris, ulerythema ophryogenes and 18p monosomy: Zouboulis syndrome. *J Dermatol* 41:371-376 (2014).
- Liberfarb RM, Breg WR, Atkins L, Holmes LB. Multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndrome due to partial 1q duplication and possible 18p deletion: a study of four individuals in two families. *Am J Med Genet* 4:27-37 (1979).
- Lindsten J, Tillinger KG. Self-perpetuating ring chromosome in a patient with gonadal dysgenesis. *Lancet* 279:593-594 (1962).
- MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 42:D986-D992 (2014).
- Maranda B, Lemieux N, Lemyre E. Familial deletion 18p syndrome: case report. *BMC Med Genet* 7:60-66 (2006).
- Meloni VA, Takeno SS, Pilla AL, de Mello CB, Melaragno MI, Kulikowski LD. Trisomy 1q32 and monosomy 11q25 associated with congenital heart defect: cytogenomic delineation and patient fourteen years follow-up. *Mol Cytogenet* 7:57-60 (2014).
- Merriman T, Twells R, Merriman M, Eaves I, Cox R, Cucca F, et al. Evidence by allelic association-dependent methods for a type 1 diabetes polygene (IDDM6) on chromosome 18q21. *Hum Mol Genet* 6:1003-1010 (1997).

- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749-764 (2010).
- Ming JE, Stiehm ER, Graham Jr JM. Immunodeficiency as a component of recognizable syndromes. *Am J Med Genet* 66:378-398 (1996).
- Ming JE, Stiehm ER. Genetic syndromic immunodeficiencies with antibody defects. *Immunol Allergy Clin North Am* 28:715-736 (2008).
- Mir A, Ansar M, Chahrour MH, Pham TL, Wajid M, Haque S, et al. Mapping of a novel autosomal recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB46) to chromosome 18p11.32-p11.31. *Am J Med Genet A* 133A:23-26 (2005).
- Mir A, Sritharan K, Mittal K, Vasli N, Araujo C, Jamil T, et al. Truncation of the E3 ubiquitin ligase component FBXO31 causes non-syndromic autosomal recessive intellectual disability in a Pakistani family. *Hum Genet* 133:975-984 (2014).
- Myers KA, Warman Chardon J, Huang L, Boycott KM. Deletion of AFG3L2 associated with spinocerebellar ataxia type 28 in the context of multiple genomic anomalies. *Am J Med Genet A* 164:3209-3212 (2014).
- Nakayama J, Hamano K, Shimakura Y, Iwasaki N, Nakahara C, Imoto N, et al. Abnormal myelination in a patient with ring chromosome 18. *Neuropediatrics* 28:335-337 (1997).
- Nazarenko SA, Ostroverkhova NV, Vasiljeva EO, Nazarenko LP, Puzyrev VP, Malet P, Nemtseva TA. Keratosis pilaris and ulerythema ophryogenes associated with an 18p deletion caused by a Y/18 translocation. *Am J Med Genet* 85:179-182 (1999).
- Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 125:e214-e224 (2010).
- Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 44:511-516 (2012).
- Pearl W. Heart disease associated with deletion of the short arm of chromosome 18. *Pediatr Cardiol* 10:174-176 (1989).
- Portnoi MF, Gruchy N, Marlin S, Finkel L, Denoyelle F, Dubourg C, et al. Midline defects in deletion 18p syndrome: clinical and molecular characterization of three patients. *Clin Dysmorph* 16:247-252 (2007).
- Recalcati MP, Valtorta E, Romitti L, Giardino D, Manfredini E, Vaccari R, et al. Characterisation of complex chromosome 18p rearrangements in two syndromic patients with immunological deficits. *Eur J Med Genet* 53:186-191 (2010).

- Rethoré MO, Larget-Piet L, Abonyi D, Boeswillwald M, Berger R, Carpentier S, et al. 4 cases of trisomy for the short arm of chromosome 9. Individualization of a new morbid entity. *Ann Genet* 4:217-232 (1970).
- Rigola MA, Plaja A, Mediano C, Miro R, Egozcue J, Fuster C. Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis. *Am J Med Genet A* 104:37-41 (2001).
- Rosen P, Hopkin RJ, Glass DN, Graham TB. Another patient with chromosome 18 deletion syndrome and juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 31:998-1000 (2004).
- Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res* 43:D670-D681 (2015).
- Rosenfeld JA, Ballif BC, Martin DM, Aylsworth AS, Bejjani BA, Torchia BS, Shaffer LG. Clinical characterization of individuals with deletions of genes in holoprosencephaly pathways by aCGH refines the phenotypic spectrum of HPE. *Hum Genet* 127:421-440 (2010).
- Rosenfeld JA, Kim KH, Angle B, Troxell R, Gorski JL, Westemeyer M, et al. Further Evidence of Contrasting Phenotypes Caused by Reciprocal Deletions and Duplications: Duplication of NSD1 Causes Growth Retardation and Microcephaly. *Mol Syndromol* 3:247-254 (2013).
- Rossi E, Riegel M, Messa J, Gimelli S, Maraschio P, Ciccone R, et al. Duplications in addition to terminal deletions are present in a proportion of ring chromosomes: clues to the mechanisms of formation. *J Med Genet* 45:147-154 (2008).
- Schaub RL, Reveles XT, Baillargeon J, Leach RJ, Cody JD. Molecular characterization of 18p deletions: evidence for a breakpoint cluster. *Genet Med* 4:15-19 (2002).
- Schaub RL, Hale DE, Rose SR, Leach RJ, Cody JD. The spectrum of thyroid abnormalities in individuals with 18q deletions. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2259-2263 (2005).
- Schinzel A, Schmid W, Luscher U, Nater M, Brook C, Steinmann B. Structural aberrations of chromosome 18. I. The 18p-syndrome. *Arch Genet* 47:1-15 (1974).
- Sebold C, Soileau B, Heard P, Carter E, O'Donnell L, Hale DE, Cody JD. Whole arm deletions of 18p: medical and developmental effects. *Am J Med Genet A* 167A:313-323 (2015).
- Simões, MR. Utilizações da WISC-III na avaliação neuropsicológica de crianças e adolescentes. *Paidéia* 12:113-132 (2002).
- Soileau B, Hasi M, Sebold C, Hill A, O'Donnell L, Hale DE, Cody JD. Adults with Chromosome 18 Abnormalities. *J Genet Couns* 24:663-674 (2015).
- Sodré CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, et al. Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res* 26:134-43 (2010).

- Sorensen RU, Leiva LE, Javier FC, Sacerdote DM, Bradford N, Butler B, et al. Influence of age on the response to *Streptococcus pneumoniae* vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 102:215- 221 (1998).
- South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med* 15:901-909 (2013).
- Sparrow SS, Balla DA, Cicchetti, DV. Vineland Adaptive Behavior Scales: interview edition. American Guidance Services Inc., Circle Pines, 1984.
- Spreiz A, Guilherme RS, Castellan C, Green A, Rittinger O, Wellek B, et al. Single-nucleotide polymorphism array-based characterization of ring chromosome 18. *J Pediatr* 163:1174-1178 (2013).
- Taalman RD, Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, Clement JM, Stoelinga GB. Chromosome studies in IgA-deficient patients. *Clin Genet* 32:81-87 (1987).
- Tabet AC, Verloes A , Pilorge M, Delaby E, Delorme R, Nygren G, et al. Complex nature of apparently balanced chromosomal rearrangements in patients with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 6:19-33 (2015).
- Tatsi C, Sertedaki A, Voutetakis A, Valavani E, Magiakou MA, Kanaka-Gantenbein C, et al. Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes. *J Clin Endocrinol Metab* 98:779-784 (2013).
- Thieffry S, Arthuis M, de Grouchy J, Lamy M, Salmon C. Deletion of the short arms of chromosome 17-18: complex deformities with oligophrenia. *Arch Fr Pediatr* 20:740-745 (1963).
- Thompson RW, Peters JE, Smith SD. Intellectual, behavioral, and linguistic characteristics of three children with 18p- syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 7:1-7 (1986).
- Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39:857-864 (2007).
- Tonk V, Krishna J. Case report: denovo inherited 18p deletion in a mother-fetus pair with extremely variable expression, confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73:193-196 (1997).
- Toydemir RM, Brassington AE, Bayrak-Toydemir P, Krakowiak PA, Jorde LB, Whitby FG, et al. A novel mutation in *FGFR3* causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am J Hum Genet* 79:935-941 (2006).
- Tsukahara M, Imaizumi K, Fujita K, Tateishi H, Uchida M. Familial Del(18p) syndrome. *Am J Med Genet* 99:67-69 (2001).
- Turleau C. Monosomy 18p. *Orphanet J Rare Dis* 3:4 (2008).

- Uchida IA, Mcrae KN, Ray M. Familial short arm deficiency of chromosome 18 concomitant with arhinencephaly and alopecia congenita. *Am J Hum Genet* 17:410-419 (1965).
- Velagaleti GV, Harris S, Carpenter NJ, Coldwell J, Say B. Familial deletion of chromosome 18 (p11.2). *Ann Genet* 39:201-204 (1996).
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351 (2001).
- Vermeulen SJ, Speleman F, Vanransbeeck L, Verspeet J, Menten B, Verschraegen-Spae MR, et al. Familial pericentric inversion of chromosome 18: behavioral abnormalities in patients heterozygous for either the dup(18p)/del(18q) or dup(18q)/del(18p) recombinant chromosome. *Eur J Hum Genet* 13:52-58 (2005).
- Vorechovský I, Blennow E, Nordenskjöld M, Webster AD, Hammarström L. A putative susceptibility locus on chromosome 18 is not a major contributor to human selective IgA deficiency: evidence from meiotic mapping of 83 multiple-case families. *J Immunol* 163:2236-2242 (1999).
- Wang HC, Melnyk J, McDonald LT, Uchida IA, Carr DH, Goldberg B. Ring chromosomes in human beings. *Nature* 195: 733-734 (1962).
- Wang X, Chinnam M, Wang J, Wang Y, Zhang X, Marcon E, et al. Thoc1 deficiency compromises gene expression necessary for normal testis development in the mouse. *Mol Cell Biol* 29:2794-2803 (2009).
- Wester U, Bondeson ML, Edeby C, Anneren G. Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A* 140A:1164-1171 (2006).
- Willoughby BL, Favero M, Mochida GH, Braaten EB. Neuropsychological function in a child with 18p deletion syndrome: a case report. *Cogn Behav Neurol* 27:160-165 (2014).
- Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, et al. Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding an ubiquitin-specific protease. *Nat Genet* 32:420-425 (2002).
- Yardin C, Esclaïre F, Terro F, Baclet MC, Barthe D, Laroche C. First familial case of ring chromosome 18 and monosomy 18 mosaicism. *Am J Med Genet* 104:257-259 (2001).
- Zamani AG, Acar A, Durakbasi-Dursun G, Yildirim MS, Ceylaner S, Tuncel E. Recurrent proximal 18p monosomy and 18q trisomy in a family due to a pericentric inversion. *Am J Med Genet A* 164A:1239-1244 (2014).
- Zhang JX, He JH, Wang J, Song J, Lei HB, Wang J, Dong WG. Associations between PTPN2 polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm Res* 63:71-79 (2014).
- Zavala J, Ramirez M, Medina R, Heard P, Carter E, Crandall A, et al. Psychiatric syndromes in individuals with chromosome 18 abnormalities. *Am J Med Genet* 153:837-845 (2010).

Zouboulis CC, Stratakis CA, Rinck G, Wegner RD, Gollnick H, Orfanos CE. Ulerythema ophryogenes and keratosis pilaris in a child with monosomy 18p. *Pediatr Dermatol* 11:172-175 (1994).

Zouboulis CC, Stratakis CA, Gollnick HP, Orfanos CE. Keratosis pilaris/ulerythema ophryogenes and 18p deletion: is it possible that the LAMA1 gene is involved? *J Med Genet* 38:127-128 (2001).

8.2 Base de dados na internet

The National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The University of Texas Health Science Center at San Antonio:
<http://pediatrics.uthscsa.edu/centers/chromosome18/index.asp>

Genome Browser Website: <https://genome.ucsc.edu/>

DatabasE of genomiC variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER): <https://decipher.sanger.ac.uk/index>

Clinical Genome Resource (ClinGen): <https://www.clinicalgenome.org/>

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Chromosome 18p deletion syndrome [del(18p)] (OMIM 146390) has been well described in the literature with over 300 patients reported on, but few of them evaluated by cytogenomic techniques. **Objective:** We studied 12 patients with 18p deletion based on clinical, developmental and cytogenomic findings. **Methods:** The patients were evaluated by a specific clinical protocol, including immunological, endocrinological and neuropsychological assessments. The cytogenetic study was performed by G-banding karyotype, SNP-array (Genome-Wide Human SNP Array 6.0, Affymetrix) and FISH-BAC techniques. **Results:** A total of 12 patients, seven males and five females, previously diagnosed with 18p deletion were evaluated. The patients were classified in three groups according to the cytogenomic findings, as follows: five with pure 18p deletion (group I), two with ring chromosome 18 (group II) and five with 18p deletion associated with duplication or deletion of another chromosome (group III). **Conclusions:** The results showed a wide variation in intra- and inter-chromosomal rearrangements in patients, both inherited as *de novo*, as well as a wide variability of phenotypic manifestations and comorbidities. Although the literature indicates 18p11.1 as the most frequent breakpoint, our patients presented different breakpoints: 18p11.21 (5/12), 18p11.23 (2/12), 18p11.31 (4/12), and 18p11.32 (1/12). The main clinical findings were: proportionate short stature; microcephaly; ectopic pituitary; growth hormone deficiency; hypothyroidism; intellectual disability; cardiac anomalies; scoliosis; and *keratosis pilaris*. The distinguished facial dysmorphic features were: ocular hypertelorism; ptosis; and strabismus. The neuropsychological assessments showed IQ scores from borderline intellectual functioning to moderate intellectual disability. The SNP-array technique permitted a better chromosome breakpoint definition and, associated to the specific clinical protocol, provided a better genotype-phenotype correlation revealing genes that might influence the patient's phenotype. Some genes located in the 18p deleted segment seem to play important roles in the patient's phenotype, such as *TGIF1*, *GNAL*, *LAMA1* and *LPIN2* genes. The clinical protocol associated with cytogenomic results provided the recognition of relevant genes to the clinical manifestations found, such as holoprosencephaly microforms, *keratosis pilaris*, cryptorchidism, scoliosis and IgA deficiency. In addition, the multidisciplinary approach of this study allowed making recommendations for medical and neuropsychological evaluation on 18p deletion patients for better clinical monitoring and appropriate genetic counseling for each family. **Keywords:** chromosome 18 deletion 18p, array, FISH, clinical protocol, genotype-phenotype correlation.

APÊNDICES

APÊNDICES

1 Publicações relacionadas aos pacientes da tese

Apêndice 1- Spreiz A, Guilherme RS, Castellan C, Green A, Rittinger O, Wellek B, Utermann B, Erdel M, Fauth C, Haberlandt E, Kim CA, Kulikowski LD, Meloni VA, Utermann G, Zschocke J, Melaragno MI, Kotzot D. Single-nucleotide polymorphism array-based characterization of ring chromosome 18. J Pediatr 163:1174-1178 (2013).

Apêndice 2- Guilherme RS, Meloni VFA, Kim CA, Pellegrino R, Takeno SS, Spinner NB, Conlin LK, Christofolini DM, Kulikowski LD, Melaragno MI. Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. BMC Med Gen 12:171-177 (2011).

Apêndice 3- Guilherme R, Meloni VA, Perez A, Pilla A, de Ramos M, Dantas A, Takeno S, Kulikowski L, Melaragno M. Duplication 9p and their implication to phenotype. BMC Med Genet 15:142-148 (2014).

Single-Nucleotide Polymorphism Array-Based Characterization of Ring Chromosome 18

Ana Spreiz, MS^{1,*}, Roberta S. Guilherme, PhD^{2,*}, Claudio Castellan, MD^{3,†}, Andrew Green, MD⁴, Olaf Rittinger, MD⁵, Brigitte Wellek, MD⁶, Barbara Utermann, MD¹, Martin Erdel, PhD^{1,7}, Christine Fauth, MD¹, Edda Haberlandt, MD⁸, Chong A. Kim, PhD⁹, Leslie D. Kulikowski, PhD⁹, Vera A. Meloni, MD², Gerd Utermann, MD¹, Johannes Zschocke, MD, PhD¹, Maria I. Melaragno, PhD^{2,*}, and Dieter Kotzot, MD¹

Objective To study genotype–phenotype correlation of ring chromosome 18 [r(18)] in 9 patients with 46,XN karyotype.

Study design In 9 patients with a de novo 46,XN,r(18) karyotype (7 females, 2 males), we performed high-resolution single-nucleotide polymorphism array analysis (Illumina Human Omni1-QuadV1 array in 6 patients, Affymetrix 6.0 array in 3 patients), investigation of parental origin, and genotype–phenotype correlation.

Results No breakpoint was recurrent. Single metaphases with loss of the ring, double rings, or secondarily rearranged rings were found in some cases, but true mosaicism was present in none of these cases. In 3 patients, additional duplications in 18p (of 1.4 Mb, 2 Mb, and 5.8 Mb) were detected. In 1 patient, an additional deletion of 472 kb in Xp22.33, including the *SHOX* gene, was found. Parental origin of r(18) was maternal in 2 patients and paternal in 4 patients, and formation was most likely meiotic. Karyotype was normal in all investigated parents (n = 15). At birth, mean maternal age was 30 years (n = 9) and mean paternal age was 34.4 years (n = 9).

Conclusion Genotype–phenotype correlation revealed extensive clinical variability but no characteristic r(18) phenotype. Severity of clinical signs were generally correlated with the size of the deletion. Patients with large deletions in 18p and small deletions in 18q exhibited mainly symptoms related to 18p-, whereas those with large deletions in 18q and small deletions in 18p had symptoms of 18q-. (*J Pediatr* 2013;163:1174-8).

Ring chromosome 18 [r(18)] was first described by Gropp et al¹ in 1964. To date, approximately 100 patients have been reported, most in case reports. Incidence is low, most likely related to both the complex mechanism of formation and the high degree of embryonic and fetal loss. A phenotype resembling deletions of 18p (18p-) and 18q (18q-) was noted.² The latter is characterized by moderate intrauterine growth retardation, brachycephaly, midface hypoplasia, smooth philtrum, everted lower lip, downturned corners of the mouth, depressed and wide nasal bridge, small teeth, deep-set eyes with downslanting palpebral fissures and epicanthic folds, dysplastic ears with a prominent antihelix and antitragus and narrow external ear canals, scoliosis and/or kyphosis, genital anomalies, coxa valga, tapering fingers, and clubfoot. Additional anomalies include heart defects, hypospadias, cleft lip/palate, deafness, low IgA levels, and short stature with low growth hormone levels.³ Deletions of the short arm of chromosome 18 are clinically characterized by short stature, brachy-microcephaly, ptosis, hypertelorism, strabismus, epicanthic folds, broad and flat nose, macrostomia, downturned corners of the mouth, abnormal teeth, micrognathia, large, protruding, and posteriorly rotated ears, short and broad neck, broad chest, pectus excavatum, scoliosis and/or kyphosis, abnormal genitalia, and broad hands and fingers.⁴ Approximately 75% of patients with r(18) are female. Few cases of parent-to-child transmission have been reported.⁵⁻⁸

Here we report on the molecular characterization of r(18) with high-resolution single-nucleotide polymorphism (SNP) microarrays and the clinical phenotype in 9 patients.

Methods

Nine patients (7 females, 2 males; 6 from Europe, 3 from South America) with r(18) detected by conventional karyotyping were analyzed with the Human Omni1-Quad V1 SNP array (Illumina, San Diego, California) (patients 1-6) or

OFC	Occipitofrontal head circumference
r(18)	Ring chromosome
SNP	Single-nucleotide polymorphism

From the ¹Division of Human Genetics, Department of Medical Genetics, Molecular and Clinical Pharmacology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria; ²Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ³Clinical Genetics Service, Department of Pediatrics, General Regional Hospital, Bolzano, Italy; ⁴National Center for Medical Genetics, Our Lady's Hospital, Crumlin, Dublin, Ireland; ⁵Department of Pediatrics, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria; ⁶Institute of Human Genetics, University Medical Center, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; ⁷Laboratory of Molecular Biology and Tumor Cytogenetics, Hospital of the Sisters of Charity, Linz, Austria (current address); ⁸Clinical Department of Pediatrics I, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria; and ⁹Children's Institute and Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

*Contributed equally.

†Deceased.

Supported by Oesterreichische Nationalbank (Anniversary Fund, 12530 [to M.E.] and 13004 [to D.K.]), Medizinischer Forschungsfonds Innsbruck (2007411 to E.H.), and Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (2010/50737-1 to M.M.). The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. Copyright © 2013 Mosby Inc. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.06.005>

the 6.0 SNP array (Affymetrix, Santa Clara, California) (patients 7-9) according to the manufacturer's instructions. Statistical analysis and visualization of the data were performed using Nexus Copy Number 5.1 (BioDiscovery, Hawthorne, California) for patients 1-6 (GRCh36/hg18) and Affymetrix Chromosome Analysis Suite (Affymetrix, Santa Clara, California) for patients 7-9 (GRCh37/hg19). Patient 7 has been reported previously.⁹

In patients 1-6, parental origin was determined by microsatellite analyses performed with primers located on the monosomic 18p and 18q regions (Metabion, Martinsried, Germany or Microsynth, Balgach, Switzerland). In these analyses, 6.6% polyacrylamide gels and silver staining were used to make the polymerase chain reaction products visible. A list of markers is available on request. The study was approved by the ethic committee of the Innsbruck Medical University (Nr. 237/4.9).

Results

In patients 7, 8, and 9, analysis of 300 cells in each patient by conventional karyotyping detected single cells with monosomy 18, double rings, and additional ring chromosomes. Based on criteria of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 2009, these findings were not considered to indicate true mosaicism.¹⁰ No lymphocytes with a normal karyotype were detected in any of the 9 patients. The chromosome analyses in 15 parents yielded normal results. Both parents of patient 3 declined chromosome analysis; the father of patient 6 was deceased.

The exact size and localization of each aberration are summarized in **Table I** and **Figure 1**. Apart from the terminal 18p and 18q deletions and the 18p duplications of 1.4 Mb, 2 Mb, and 5.8 Mb in patients 4, 5, and 6, respectively, no additional obviously pathogenic copy number variations (≥ 200 kb) were detected, except for a 472-kb hemizygous interstitial deletion in Xp22.33, including the short stature homeobox gene (*SHOX*), in patient 4.

Microsatellite mediated haplotype analysis revealed no paternal alleles in patients 3-6 and no maternal alleles in

patients 1 and 2, indicating de novo events, most likely in meiosis. All parents were healthy and nonconsanguineous. The average maternal age was 30 years ($n = 9$), and the average paternal age was 34.4 years ($n = 9$). Because of the small number of parents and their heterogeneity of origin, no further statistical analyses or comparisons of the average parental ages were performed.

The clinical features of the study group are summarized in **Table II** (available at www.jpeds.com). Five of the patients are depicted in **Figure 2**. At birth, 1 patient was below the 10th percentile in weight, 4 patients were below the 10th percentile in length, and 3 patients were below the 10th percentile in occipitofrontal head circumference (OFC). At the last evaluation, 3 of 6 patients were below the 10th percentile in weight, all patients were below the 10th percentile in height, and 7 patients were below the 10th percentile in OFC. Microcephaly (ie, OFC below the 3rd percentile) was present in 6 patients. Intellectual disability, delayed milestones, and speech delay were observed in all patients. Various congenital anomalies, including heart defects ($n = 3$), skeletal anomalies ($n = 4$), urogenital anomalies ($n = 2$), and endocrinologic abnormalities ($n = 2$) were also noted. Apart from the more frequently observed downturned corners of the mouth ($n = 4$), up-slanting palpebral fissures, hypertelorism ($n = 4$), strabismus ($n = 6$), a flattened midface ($n = 6$), and dysplastic ears ($n = 7$), no typical facial dysmorphism were noted. Reduced fetal movement was reported in 2 patients, and feeding difficulties were noted in 3 patients.

Discussion

Here we present a systematic analysis of patients with de novo r(18) with high-resolution SNP arrays and report on the breakpoints, parental origin, and clinical phenotypes. The phenotype of r(18) is characterized by intellectual disability and multiple congenital anomalies, such as microcephaly, short stature, genital anomalies, and various minor dysmorphism.² However, most of these features are nonspecific and found in a range of monogenic syndromes as well as chromosomal aberrations, including ring chromosomes.² Moreover,

Table I. Karyotypes according to the array data (GRCh36/hg18 for patients 1-6; GRCh37/hg19 for patients 7-9), sizes of the deletions on 18p and 18q and duplications on 18p, and parental origin of the ring (18) chromosomes

Patient	Sex	Array karyotype	del 18p	dup 18p	del 18q	Parental origin of r(18)
1	Male	arr 18p11.1(2,842-15,400,816)x1,18q21.31(53,526,651-76,116,152)x1	15.4 Mb	-	22.6 Mb	Maternal
2	Female	arr 18p11.32(2,842-1,591,784)x1,18q22.1(61,064,429-76,116,152)x1	1.6 Mb	-	15 Mb	Maternal
3	Female	arr 18p11.1(2,842-15,400,816)x1,18q23(72,849,945-76,116,152)x1	15.4 Mb	-	3.3 Mb	Paternal
4	Female	arr 18p11.32p11.31(2,842-6,590,605)x1,18p11.31p11.23(6,593,954-7,952,084)x3,18q21.2q23(51,798,445-76,116,152)x1,Xp22.33(320,108-781,556)x1	6.6 Mb	1.4 Mb	24.3 Mb	Paternal
5	Female	arr 18p11.32p11.32(2,842-2,442,252)x1,18p11.32p11.31(2,444,530-4,507,485)x3,18q21.2q23(47,124,200-76,116,152)x1	2.4 Mb	2 Mb	29 Mb	Paternal
6	Female	arr 18p11.32p11.31(2,842-5,822,745)x3,18q22.1q23(63,204,777-76,116,152)x1	-	5.8 Mb	12.9 Mb	Paternal
7	Male	arr 18p11.32(11,542-1,383,478)x1,18q22.2q23(66,866,885-78,015,057)x1	1.4 Mb	-	11 Mb	NA
8	Female	arr 18q21.33q23(59,308,672-78,015,057)x1	-	-	18.7 Mb	NA
9	Female	arr 18p11.32p11.21(11,542-15,249,167)x1,18q23(76,330,387-78,015,057)x1	15.2 Mb	-	1.7 Mb	NA

NA, not analyzed.

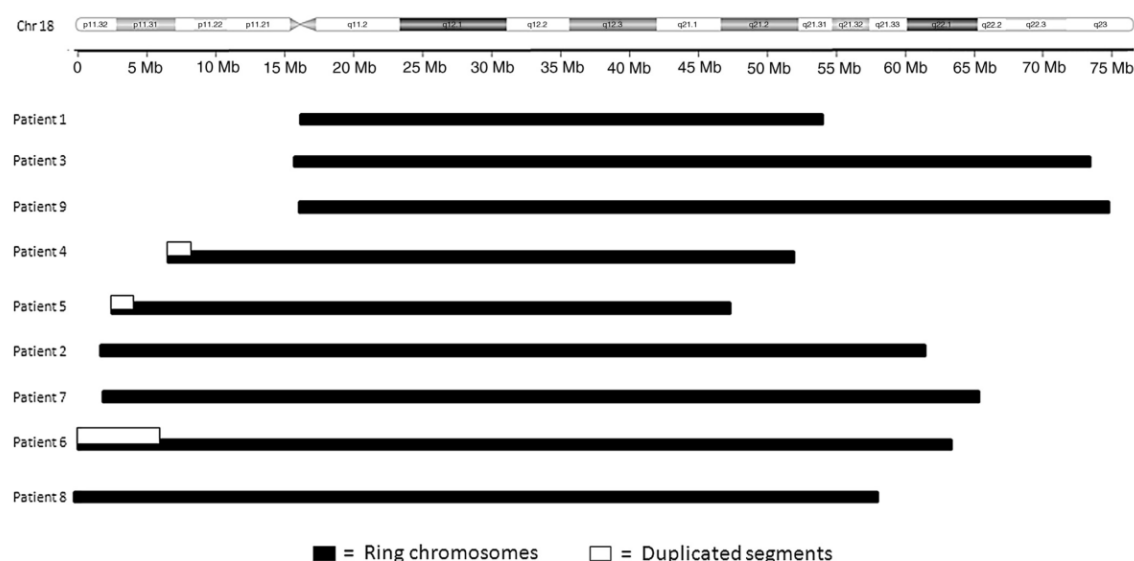


Figure 1. Scheme of the size and structure of r(18) in patients 1-9. Ideograms obtained from Nexus 5.1. Black, size of the ring chromosomes; white, size of the duplications.

a reliable genotype–phenotype correlation is hampered by the lack of exact data on individual breakpoints.

In 151 patients with an 18q- karyotype, Cody et al¹¹ determined a penetrance of 25% (13 of 52) for kidney malformation, 100% (n = 80) for dysmyelination, 90% (80 of 89) for growth hormone response failure, and 78% (81 of 104) for aural atresia, and narrowed the critical region for these traits to 18q22.3 to 18q23. Our study confirms the low penetrance for kidney malformation, with only 1 affected patient out of 7 with an 18q deletion breakpoint proximal to the foregoing critical region. Aural atresia was not seen in any of our patients.

The deletions in our patients 1, 3, 4, and 9 included the *TGIF* gene in 18p11.31. Heterozygote mutations in *TGIF*, which acts as a transcriptional repressor, are found in 1.7% of patients with holoprosencephaly.¹² Variable expression and reduced penetrance are well known¹² and might explain the unremarkable brain magnetic resonance imaging findings in our patient 9 and the lack of clinical features associated with microforms of this brain malformation in patients 1, 3, and 4. Brain magnetic resonance imaging was performed in only 5 patients, and revealed dysmyelination in patients 7 and 9.

In patient 5, the *TCF4* gene, which is located on 18q21.2 and accounts for Pitt-Hopkins syndrome (Online Mendelian Inheritance in Man 610954), is within the 18q deletion.^{13,14} Pitt-Hopkins syndrome is characterized by severe intellectual disability, facial dysmorphism, epilepsy, and breathing anomalies. Patient 5 did not have a breathing anomaly, however. Marangi et al¹⁵ reported that not all patients with *TCF4* mutations have hyperventilation or apnea (2 of 14 patients).

Patients 3 and 9 exhibited an almost complete loss of 18p and similar breakpoints in 18q23. Along with the features present in all patients with r(18), both had cardiovascular anomalies and pectus excavatum. The latter was not present in any of our other 7 patients and is not reported in patients with 18p- or 18q- syndrome. Patient 1, who also had a complete loss of 18p but a more proximal breakpoint in 18q21.31, exhibited cardiovascular anomalies but no pectus excavatum. Comparing this patient, who had the smallest ring chromosome, with the patients with the largest rings (patients 6 and 7) shows differences in growth and intellectual disability, but not in malformations or major dysmorphism.

In patients with various deletions in 18p, Brenk et al¹⁶ mapped seizures to the distal 8 Mb of 18p. Seizures were reported only in patient 2, with a small deletion in 18p (1.6 Mb), and in patient 9, with almost complete loss of the whole short arm (15.5 Mb). A generally less severe phenotype in 18p- compared with 18q- is also indicated by a report of 6 familial deletions.¹⁶

The telomeric localization of a region relevant for growth might explain growth retardation in almost all patients with r(18). However, growth retardation is also a hallmark of ring chromosomes originating from other chromosomes and is considered a consequence of mitotic ring instability.^{9,17,18} In our patient 4, growth retardation is most likely a combined result of r(18) and the additional interstitial deletion in Xp22.33, where *SHOX*, a gene relevant for growth, is located. *SHOX* haploinsufficiency is also associated with Léri-Weill syndrome (Online Mendelian Inheritance in Man 127300), of which patient 4 shows no features.



Figure 2. A, Patient 1 at age 15 months and 9 years; B, patient 2 at age 1 year and 22 years; C, patient 6 at age 49 years; D, patient 7 at age 11 years; and E, patient 9 at age 13.5 years.

Taken together, our findings indicate that a clear genotype-phenotype correlation is not possible in our 9 patients, and no typical r(18) phenotype can be defined. However, developmental delay and severity of general impairment seem to correlate with the size of the deletions in 18p and 18q.

Ring chromosomes are formed mainly by deletions of parts of the short and/or long arm of a chromosome and reunion of both ends or by telomere-to-telomere fusion without loss of euchromatic material.¹⁹ The exact assignment of the structure and breakpoints of ring chromosomes by conventional karyotyping is often difficult. Only a few published studies have applied DNA arrays to characterize the structure and breakpoints of r(18) at a kilobyte level.²⁰⁻²⁴ Rossi et al²¹ investigated 33 patients with various ring chromosomes, including 6 patients with r(18), and found additional duplications in 18p varying from 5.4 Mb up to the entire p arm in the latter. They also found additional duplications, ranging from 785 kb up to 22.8 Mb, in 6 of their remaining 27 probands (22%). The authors concluded that the stabilization of inv dup del rearrangements might be an additional mechanism of ring chromosome formation. In our cohort, additional duplications in distal segments of 18p were present in 3 patients (4, 5, and 6), ranging in size from 1.4 Mb in patient

4 to 5.8 Mb in patient 6. Combining the results of Rossi et al²¹ with our results, 6 of 15 patients (40%) with r(18) had an additional segmental duplication, which thus seems not a rare finding in patients with r(18).

We cannot determine how much additional 18p duplications carrying 5, 15, and 33 genes in patients 4, 5, and 6 of our study might contribute to the phenotypes of their carriers. The duplication in patient 6 includes the duplication in patient 5, but none of the 15 genes located in this chromosomal segment is associated with a well-known phenotype caused by an increased gene dosage. Furthermore, a well-known copy number variation of approximately 330 kb has been identified within the duplicated region.²⁵

Up to now, parental origin and mechanism of formation have been investigated only in single patients with r(18). Baumer et al²⁶ reported formation of both ring chromosomes in maternal meiosis in a patient with a r(18) in all lymphocytes and an additional second smaller r(18) in 56% of cells. In a subgroup (n = 19) of their series of 33 patients with ring chromosomes of various chromosomal origin, Rossi et al²¹ found maternal origin in 6 patients; for r(18), 2 of 3 were of paternal origin. Stankiewicz et al²⁷ reported on paternal origin in a patient with a

46,XX,dup(18)(p11.32)/47,XX,dup(18)(p11.32),+r(18) karyotype. Combining the foregoing results with our data, the r(18) was of paternal origin in 7 patients and of maternal origin in 4 of these patients.

Microsatellite-mediated haplotype analysis could not distinguish between meiotic and early postzygotic formation. In addition, secondarily emerging mosaicism is frequently found in patients with ring chromosomes. Only several cases of r(18) showing true mosaicism with a normal cell line according to the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature have been reported to date.⁷ This seems to be completely different to the situation in r(20), where true mosaicism without loss of subtelomeric regions was reported in 21 of 28 patients, indicating postzygotic formation.²⁸ Moreover, these 21 patients showed no additional deletions or duplications on the ring chromosome, whereas such duplications were found in 2 of the 7 nonmosaic r(20) patients. Thus, additional duplications might be a clue as to meiotic formation.

In summary, our SNP array-based characterization of 9 patients with r(18) shows that apparently simple chromosome aberrations might be more complex than previously thought. Genotype-phenotype correlation illustrates that there is no typical phenotype in patients with r(18), and that the phenotype reflects the preponderant localization of the deletion (18p or 18q) and does not depend simply on the size of the genomic rearrangement. Apparently, the interaction and thereby modification of the expression of the affected genes are equally or even more important. ■

We thank the patients and their families for their excellent cooperation.

Submitted for publication Sep 10, 2012; last revision received Apr 23, 2013; accepted Jun 6, 2013.

Reprint requests: Dr med Dieter Kotzot, MD, Division of Human Genetics, Department of Medical Genetics, Molecular and Clinical Pharmacology, Schoepfstr 41, A-6020 Innsbruck, Austria. E-mail: DieterKotzot@gmx.de or Prof Dr Maria I. Melaragno, PhD, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: melaragno.morf@epm.br

References

- Gropp A, Jussen A, Oftringer K. Multiple congenital anomalies associated with a partially ring-shaped chromosome probably derived from chromosome 18 in man. *Nature* 1964;202:829-30.
- Schinzl A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed. Berlin: De Gruyter Verlag; 2001.
- Heard PL, Carter EM, Crandall AC, Sebold C, Hale DE, Cody JD. High-resolution genomic analysis of 18q- using oligo-microarray comparative genomic hybridization (aCGH). *Am J Med Genet* 2009;149A:1431-7.
- Turleau C. Monosomy 18p. *Orphanet J Rare Dis* 2008;19:3-4.
- Christensen KR, Friedrich U, Jacobsen P, Jensen K, Nielsen J, Tsuboi T. Ring chromosome 18 in mother and daughter. *J Ment Defic Res* 1970;14:49-67.
- Donlan MA, Dolan CR. Ring chromosome 18 in a mother and son. *Am J Med Genet* 1986;24:171-4.
- Fryns JP, Kleczkowska A, Smeets E, van den Berghe H. Transmission of ring chromosome 18 46, XX/6, XX, r(18) mosaicism in a mother and ring chromosome 18 syndrome in her son. *Ann Genet* 1992;35:121-3.
- Balci S, Tümer C, Karaca Ç, Bartsch O. Familial ring (18) mosaicism in a 23-year-old young adult with 46, XY, r(18)(::p11->q21::)/46, XY karyotype, intellectual disability, motor retardation and single maxillary incisor and in his phenotypically normal mother, karyotype 47, XX,+r(18)(::p11->q21::)/46, XX. *Am J Med Genet* 2010;155A:1129-35.
- Sodré CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, et al. Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res* 2010;9:134-43.
- Shaffer LG, Slova ML, Campbell LJ. ISCN 2009: International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Unionville (CT): Karger; 2009.
- Cody JD, Heard PL, Crandall AC, Carter EM, Li J, Hardies LJ, et al. Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q-phenotypes. *Am J Med Genet* 2009;149A:1421-30.
- Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, Belleguic M, et al. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J Med Genet* 2011;48:752-60.
- Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, et al. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 2007;80:988-93.
- Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet* 2007;80:994-1001.
- Marangi G, Ricciardi S, Orteschi D, Lattante S, Murolo M, Dallapiccola B, et al. The Pitt-Hopkins syndrome: report of 16 new patients and clinical diagnostic criteria. *Am J Med Genet* 2011;155A:1536-45.
- Brenk CH, Prott EC, Trost D, Hoischen A, Walldorf C, Radlwimmer B, et al. Towards mapping phenotypic traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 2007;15:35-44.
- Kosztolányi G. The genetics and clinical characteristics of constitutional ring chromosomes. *J Assoc Genet Technol* 2009;35:44-8.
- Maranda B, Lemieux N, Lemyre E. Familial deletion 18p syndrome: case report. *BMC Med Genet* 2006;14:60.
- Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press; 2012.
- Mello AL, Crotwell PL, Flanagan JD, Woltanski AR, Keppen LD, Van Eerden P, et al. Clinical course of a 20-month-old child diagnosed prenatally with mosaic ring chromosome 18 and monosomy 18. *S D Med* 2008;61:327-9.
- Rossi E, Riegel M, Messa J, Gimelli S, Maraschio P, Ciccone R, et al. Duplications in addition to terminal deletions are present in a proportion of ring chromosomes: clues to the mechanisms of formation. *J Med Genet* 2008;45:147-54.
- Chen CP, Kuo YT, Lin SP, Su YN, Chen YJ, Hsueh RY, et al. Mosaic ring chromosome 18, ring chromosome 18 duplication/deletion and disomy 18: perinatal findings and molecular cytogenetic characterization by fluorescence in situ hybridization and array comparative genomic hybridization. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010;49:327-32.
- Lo-Castro A, El-Malhany N, Galasso C, Verrotti A, Nardone AM, Postorivo D, et al. De novo mosaic ring chromosome 18 in a child with mental retardation, epilepsy and immunological problems. *Eur J Med Genet* 2011;54:329-32.
- Benini R, Saint-Martin C, Shevell MI, Bernard G. Abnormal myelination in ring chromosome 18 syndrome. *J Child Neurol* 2012;27:1042-7.
- Pinto D, Marshall C, Feuk L, Scherer SW. Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet* 2007;16(Special Issue 2):R168-73.
- Baumer A, Giovannucci Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Rothlisberger B, Schinzl A. Meiotic origin of two ring chromosomes 18 in a girl with developmental delay. *Am J Med Genet* 2002;113:101-4.
- Stankiewicz P, Brozek I, Hélias-Rodzewicz Z, Wierzbicka J, Pilch J, Bocian E, et al. Clinical and molecular-cytogenetic studies in seven patients with ring chromosome 18. *Am J Med Genet* 2001;101:226-39.
- Conlin LK, Kramer W, Hutchinson AL, Li X, Riethman H, Hakonarson H, et al. Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients. *J Med Genet* 2011;48:1-9.

Table II. Clinical details for the patients with ring chromosome 18										
Characteristic	Patient									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sex	Male	Female	Female	Female	Female	Female	Male	Female	Female	Female
Parental ages (mother/ father), years	39/36	30/26	23/28	26/27	41/50	24/35	21/25	36/43	30/40	30/40
Pregnancy history	Reduced fetal movement, umbilical cord entanglement (2x)	Normal		Reduced fetal movement	Normal	Normal	Normal	Oligohydramnios in week before delivery	Home birth	
Birth week	38	41	39	39	36	39	37	39	40	
Birth mode	Spontaneous	Cesarean	Spontaneous	Cesarean	Spontaneous	Spontaneous	Spontaneous	Cesarean		
Birth weight, g (percentile)	2500 (10th-50th)	3300 (10th-50th)	2730 (10th-50th)	2300 (<10th)	2990 (10th-50th)	2990 (10th-50th)	2430 (10th-50th)	2665 (10th-50th)		
Birth length, cm (percentile)	42 (<10th)	50 (50th)	48.5 (50th)	46 (<10th)	48 (10-50th)	48 (10-50th)	43.2 (<10th)	43 (<10th)		
Birth OFC, cm, (percentile)	33 (<10th)	33 (<10th)	32 (10th)				32.5 (50th-90th)	30 (<10th)		
Apgar scores	4/5/10	4/9/9	9/10/10							
Neonatal complications	Feeding difficulties	Cyanosis and tachypnea; oligohydramnion; multifocal hypsarrhythmias	Feeding difficulties; secundum atrial septal defect	Persistent ductus arteriosus	Contractures of fingers; anterior placed anus	Feeding difficulties	Cyanosis			
Age at last follow-up, years	9 10/12	22	7 10/12	14	1 6/12	39 2/12	11 1/12	7 2/12	13 6/12	14
Weight, kg (percentile)	19 (<3th)	45.5 (3rd-10th)	18.3 (<3rd)	25 (<3rd)	10th percentile	58 (50th-75th)	29 (10th-25th)	17 (3rd)	43.4 (25th)	
Height, cm (percentile)	100 (<3th)	148 (<3th)	109.5 (<3rd)		10th percentile	151 (<3rd)	122 (<3rd)	107 (<3rd)	146.5 (3rd-10th)	
OFC, cm (percentile)	48 (<3th)	53 (10th-25th)	47 (<3rd)	47 (<3rd)	3rd percentile	53.5 (10th-25th)	50.3 (<3rd)	43 (<3rd)	51.5 (3rd-10th)	
Dysmorphic features										
Brachycephaly	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5/9
Microcephaly	+	-	+	+	+	-	+	+	-	6/9
Hair/hairline	Thin hair, high frontal hairline									
Shape of face	Round		Round			Round	Round	Oval	Round	
Synophrys	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
Palpebral fissures	Normal	Normal	Up-slanting	Up-slanting	Up-slanting	Up-slanting	Normal	Up-slanting	Up-slanting	4/9
Hyperelorism	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6/9
Strabismus	-	-	-	+	-	-	+	+	+	2/3
Nystagmus	+	-	-	+	-	-	+	+	+	2/2
Epicanthic folds	Epicanthus inversus	+	-	+	-	-	+	-	+	4/8
Prosis	+	+	+	-	-	+	+	+	+	6/8
Flattened midface	Small	Bulbous nasal tip	Bulbous nose	Bulbous nasal tip	High nasal bridge	High nasal bridge	Upturned Short columella	Short columella	Broad nasal bridge	
Nose					Upturned nasal tip Long (1.8 cm)	Upturned nasal tip Long (1.8 cm)	Short columella	Smooth	Bulbous nasal tip	
Philtrum	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	Down-turned corners	

(continued)

ICD: inner canal distance; *IPD*: interpupillary distance; *MRI*: magnetic resonance imaging; *OOD*: outer canal distance; \sum : positive number in relation to the number of patients for which this information was available. + indicates present, - indicates absent.

Apêndice 2 Guilherme et al., 2011.

Guilherme et al. *BMC Medical Genetics* 2011, **12**:171
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/171>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences

Roberta S Guilherme^{1*}, Vera F Ayres Meloni¹, Chong A Kim², Renata Pellegrino³, Sylvia S Takeno¹, Nancy B Spinner⁴, Laura K Conlin⁴, Denise M Christofolini⁵, Leslie D Kulikowski⁶ and Maria I Melaragno¹

Abstract

Background: The breakpoints and mechanisms of ring chromosome formation were studied and mapped in 14 patients.

Methods: Several techniques were performed such as genome-wide array, MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) and FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization).

Results: The ring chromosomes of patients I to XIV were determined to be, respectively: r(3)(p26.1q29), r(4)(p16.3q35.2), r(10)(p15.3q26.2), r(10)(p15.3q26.13), r(13)(p13q31.1), r(13)(p13q34), r(14)(p13q32.33), r(15)(p13q26.2), r(18)(p11.32q22.2), r(18)(p11.32q21.33), r(18)(p11.21q23), r(22)(p13q13.33), r(22)(p13q13.2), and r(22)(p13q13.2). These rings were found to have been formed by different mechanisms, such as: breaks in both chromosome arms followed by end-to-end reunion (patients IV, VIII, IX, XI, XIII and XIV); a break in one chromosome arm followed by fusion with the subtelomeric region of the other (patients I and II); a break in one chromosome arm followed by fusion with the opposite telomeric region (patients III and X); fusion of two subtelomeric regions (patient VII); and telomere-telomere fusion (patient XII). Thus, the r(14) and one r(22) can be considered complete rings, since there was no loss of relevant genetic material. Two patients (V and VI) with r(13) showed duplication along with terminal deletion of 13q, one of them proved to be inverted, a mechanism known as inv-dup-del. Ring instability was detected by ring loss and secondary aberrations in all but three patients, who presented stable ring chromosomes (II, XIII and XIV).

Conclusions: We concluded that the clinical phenotype of patients with ring chromosomes may be related with different factors, including gene haploinsufficiency, gene duplications and ring instability. Epigenetic factors due to the circular architecture of ring chromosomes must also be considered, since even complete ring chromosomes can result in phenotypic alterations, as observed in our patients with complete r(14) and r(22).

Background

Ring chromosomes usually result from two terminal breaks in both chromosome arms, followed by fusion of the broken ends, or from the union of one broken chromosome end with the opposite telomere region, leading to the loss of genetic material [1]. Alternatively, they can be formed by fusion of subtelomeric sequences or telomere-telomere fusion with no deletion, resulting in complete ring chromosomes [1-5]. Based on high-resolution molecular karyotyping, other mechanisms of formation of ring chromosomes have been proposed, such

as a terminal deletion and a contiguous inverted duplication due to an inv-dup-del rearrangement [6-8]. McGinnis et al [9] analyzed 11 cases of r(21) and found two different mechanisms of ring formation, one resulting from breakage and reunion of the long arms of an intermediate isochromosome or Robertsonian translocation chromosome generating a large dicentric r(21) and the other resulting from breakage in both the short and the long arms of chromosome 21, followed by reunion, duplication and exchange between sister chromatids.

Ring chromosomes have been found for all human chromosomes. Usually the phenotype of ring chromosome patients overlaps that of the deletion of both ends of the respective chromosome syndromes [10]. Nevertheless, the phenotypes associated with ring chromosomes are highly variable, since - in addition to the primary

* Correspondence: robertaguilherme@hotmail.com

¹Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, Botucatu Street 740, Zip Code 04023-900, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Guilherme et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

deletion associated with ring formation - secondary loss or gain of material may occur, due to ring chromosome instability [11-15]. In patients with ring chromosomes, sister chromatid exchanges occurring during mitosis usually result in secondary chromosomal abnormalities, such as dicentric rings, interlocked rings, and other structural conformations. These unstable chromosomes can also lead to ring chromosome loss, producing monosomic cells, which may or may not be viable [16-20]. Thus, apart from the deletions due to ring formation, ring instability can also result in other genomic imbalances, with decrease or increase of genetic material and possible consequences on the phenotype.

We report here the mechanisms of ring chromosome formation and ring instability in 14 patients evaluated by cytogenetic and molecular techniques and we discuss their clinical consequences.

Methods

Patients

We analyzed 14 patients (Figure 1) carrying *de novo* rings derived from chromosomes 3, 4, 10 (two cases), 13 (two cases), 14, 15, 18 (three cases), and 22 (three cases). Patient I, VI and VII were previously reported [20-22]. This study was approved by the ethics committee of the University Federal of São Paulo (CEP 1485-07). Written informed consent was obtained from the patients for publication of this report and accompanying images.

Clinical Data

Patient I. 10 year-old boy, intra uterine growth retardation (IUGR), short stature, triangular face, long and smooth philtrum, retrognathia, large ears, hypoplastic

scrotum, cryptorchidism, crossed renal ectopia, moderate development delay and intellectual deficiency.

Patient II. 11 year-old girl, IUGR, short stature, microcephaly, prominent nasal bridge, pointed and long nose, short philtrum, high palate, dysmorphic ears, hypotonia, neuro-psychomotor delay and intellectual deficiency.

Patient III. 14 year-old boy, short stature, dolico-trigonocephaly, bilateral epicanthic folds, upslanting palpebral fissures, ocular hypertelorism, left palpebral ptosis, myopia, strabismus, low-set and simplified auricles, broad nasal root, depressed nasal bridge, retrognathism, high-arched palate, long hands, cervical kyphosis, systolic dysfunction with minimal mitral and tricuspid reflux and dilatation of the left ventricle, vesico-urethral reflux, speech delay and intellectual deficiency.

Patient IV. 22 year-old girl, short stature, microcephaly, large nasal bridge, long philtrum, dysmorphic ears, esotropia, dermal hypopigmentation regions, semi-flexed legs, Dandy-Walker variant cist, esotropia and mild optic nerve dysplasia at right, osteopenia, ulna shortening, bent legs, hypotonia, neuro-psycho-motor delay and intellectual deficiency. **Patient V.** First genetic evaluation on 3 year-old boy, preterm, IUGR, microcephaly, narrow and oblique forehead, upslanting palpebral fissures, ocular hypertelorism, prominent nasal bridge, high palate, prominent incisors, large and dysmorphic ears, peno-scrotal inversion, scrotal hypoplasia, prominent and large halluces, renal ectopia, hypotonia and severe neuro-psycho-motor delay. **Patient VI.** One year-old boy, IUGR, microsomia, microcephaly, micrognathism, bilateral epicanthic folds, long eyelashes, small nose, prominent nasal bridge, long philtrum, broad helices, low set dysmorphic ears, high palate, thin upper lip, high palate,



Figure 1 Patients I-V, VII-IX and XI-XIV, who present ring chromosomes 3, 4, 10, 10, 13, 14, 15, 18, 22, 22 and 22 at ages 16, 12, 14, 22, 8, 23, 28, 7, 11, 7, 24, and 2, respectively. Patients VI and IX (ring 13 and 18) did not allow picture publication.

thoraco-lombar scoliosis, right feet pos-axial polydactyly, hypotonia and neuro-psychomotor development delay.

Patient VII. 23 year-old male, downslanting palpebral fissures, prominent nose, broad nasal bridge, thin upper lip, upper anus implantation and decreased subcutaneous tissue in gluteal region, hypotrophy of the of the lower limbs, club feet with scar on internal edges from anterior surgical repair, protrusion of the calcaneus, and mild intellectual deficiency. **Patient VIII.** 22 year-old female, short stature, microcephaly, brachycephaly, high forehead, exotropia, hipoplastic alae nasi, hiperextensible knees, rough and drought skin of the lower limbs, generalized hirsutism and mild intellectual disability.

Patient IX. 7 year-old boy, short stature, microcephaly, brachycephaly, middle face hypoplasia, upper slanting palpebral fissures, ocular hypertelorism, large mouth, downturned angles of mouth, high-arched palate, bifid uvula, peno-scrotal hypospadias, bifid scrotum, bilateral cryptorchidism, bilateral inguinal hernia, vesico-urethral reflux (grade III), recurrent pulmonary and urinary infections, subclinical hypothyroidism and eczema, hypotonia and moderate neuro-psychomotor development delay. **Patient X.** 5 year-old girl, short stature, esotropia, bilateral epicanthic folds, downturned angles of mouth, large and posterior rotated ears, clinodactyly of 5th fingers, gastro-esophageal reflux and atrial/tricuspid cardiac defects corrected by surgery. **Patient XI.** 11 year-old girl, short stature, ocular hypertelorism, thick eyebrows, esotropia, right palpebral ptosis, bulbous nose, one pre auricular appendix and two pre-auricular pit at right, hepatomegaly and splenomegaly, IgA immunodeficiency, chronic hepatitis, renal tubular acidosis, neuro-psychomotor delay and intellectual deficiency. **Patient XII.** 6 year-old girl, microcephaly, prominent forehead, low set nasal bridge, pectus excavatum, asymmetry the lower limbs, depigmented patches in the upper limbs, minimal ventricular septal defect, mild dysplasia of the tricuspid valve and mild developmental delay. **Patient XIII.** 24 year-old male, hypotonia, elongated and concave face, prominent nose, large and prominent dysmorphic ears, two *café-au-lait* spots, chest asymmetry, dorso-lombar scoliosis, C2-C3 vertebral fusion, neuro-psychomotor delay and intellectual deficiency. **Patient XIV.** Two year-old girl, irregular teeth, large nose, small mouth, a small supernumerary nipple at left, proximal implantation of halluces, hypotonia and mild motor development delay.

Cytogenetic study

Peripheral blood lymphocytes were obtained from 72-hour cultures and prepared according to standard cytogenetic procedures. Ring instability was verified by counting 300 cells for each patient: 200 after G-banding and 100 using FISH with centromeric or

pericentromeric probes (Cytocell, Cambridge, UK) (Figure 2). FISH using pantelomeric probe (Star[®]FISH Human Chromosome Pantelomeric Probe, Cambio, Cambridge, UK) was performed in cases without terminal deletion, in order to investigate the presence of telomere regions in the ring chromosomes. In patient VI, we also performed FISH with BAC (bacterial artificial chromosomes) probes (RP11-266L23 and RP11-116L22), to determine whether the duplicated region was inverted or not (Figure 3). In patient XIV, FISH was performed using DiGeorge/VCFS-Tuple1 (Cytocell, Cambridge, UK) to confirm the 22q deletion.

Molecular studies

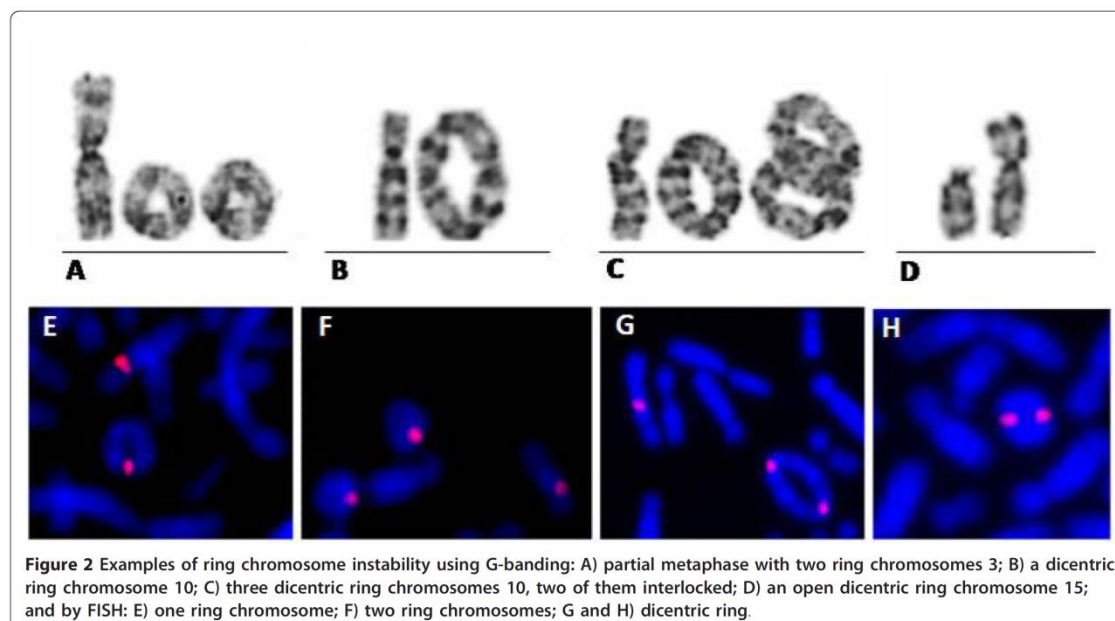
DNA was isolated from peripheral blood using the Genra Puregene kit (Qiagen-Sciences, Maryland, USA). The MLPA assay was performed using the *P070 Human telomere 5 probemix kit* (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) with subtelomeric probes. The MLPA results were analyzed by means of the GeneMarker software. For the array experiments, two different techniques were used: (1) Illumina Quad610 array (Illumina BeadStation, San Diego, CA, USA), performed at the Center for Applied Genomics of the Children's Hospital of Philadelphia according to [23]; (2) for nine patients, the array analysis was also performed at the MolecularCore AFIP laboratory in São Paulo, using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), followed by standard protocol and as previously described by Guilherme et al [21]. The array data was analyzed using annotation GRCh36/hg18.

Results

Table 1 show that the ring loss frequency in the different patients varied from 1.7% to 12.7% in metaphase cells, and of secondary aberrations (duplicated ring, two rings, interlocked rings or open ring) from 0.3% to 6.3%. The total of cells with chromosome instability varied from 4.0% to 16.3%. Table 2 shows the cytogenetic and molecular results obtained for the patients and the deleted regions of the ring chromosomes. Patient XIV presented, in addition to the terminal deletion in 22q, a 22q11.2 deletion in the ring chromosome, confirmed by FISH.

The SNP array and FISH results obtained for patient VI who has an r(13) revealed a 43.5 Mb inverted duplication at 13q21.33q34 followed by a 364 kb terminal deletion at 13q34 (Figure 3).

In the patients reported here, different mechanisms of ring formation were found: breaks in both chromosome arms followed by end-to-end reunion (patients IV, VIII, IX, XI, XIII and XIV), a break in one chromosome arm followed by fusion with the subtelomeric region of the



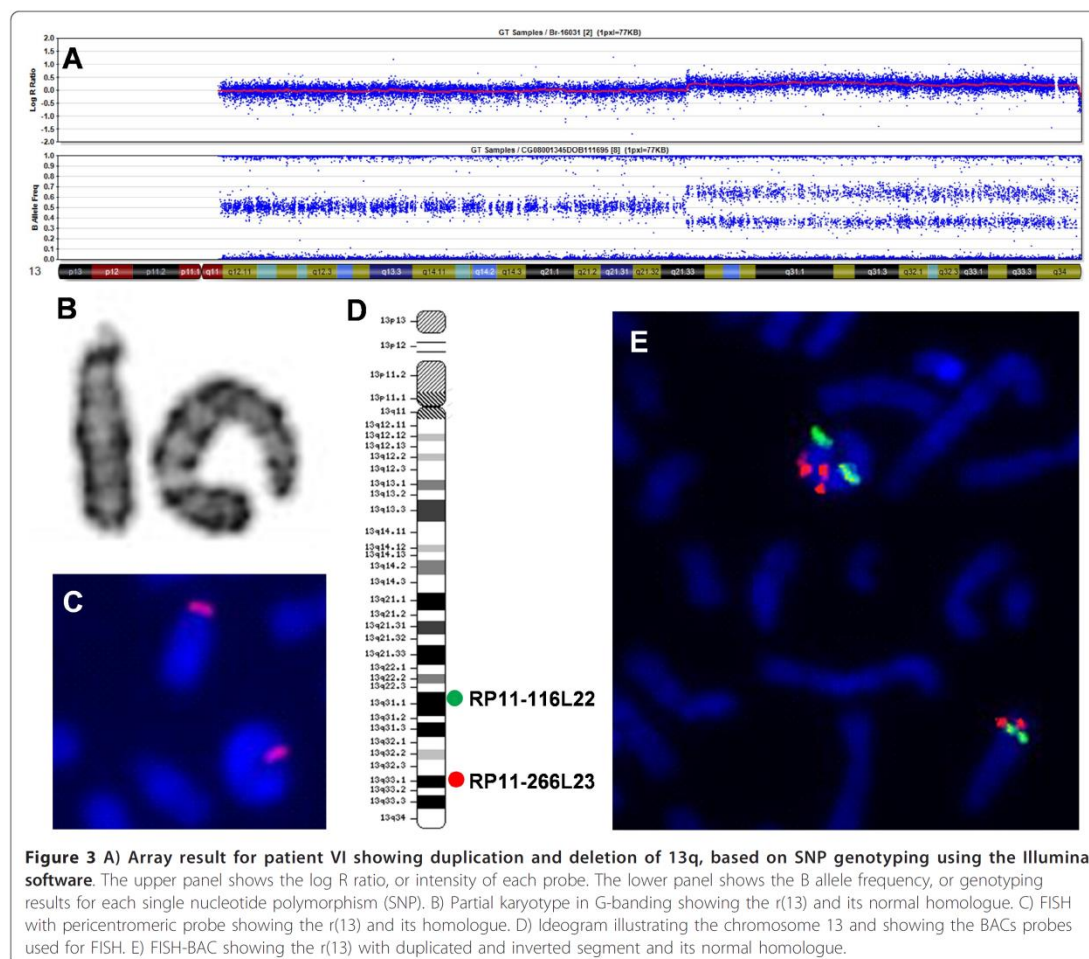
other (patients I and II), a break in one chromosome arm followed by fusion with the opposite telomeric region (patients III and X), fusion of two subtelomeric regions (patient VII), and telomere-telomere fusion (patient XII). Thus, the r(14) and one r(22) can be considered complete rings, since there was no loss of relevant genetic material. A more complex mechanism of formation was found in both patients with r(13), with a terminal deletion but also with a contiguous duplication. In patient VI, the duplicated 43.5 Mb segment next to the breakpoint at 13q34 was inverted. In patient V, it was not possible to confirm if the duplicated segment was also inverted.

Discussion

In this work, the array and FISH techniques allowed determination of the breakpoints and genomic unbalances and also definition of the mechanism of formation of the ring chromosomes. We identified several ring chromosome formation mechanisms, including rings with deletion in one or both arms, complete rings, and rings formed by a complex mechanism, due to inv-dup-del in two patients with ring chromosomes 13. The MLPA assay allowed evaluating the presence of subtelomeric regions in the ring chromosomes.

According to Kosztolányi [24], a ring chromosome is considered unstable when secondary aberrations were found in more than 5% of the mitoses counted. Thus, most of our patients showed unstable ring chromosomes, except patient II who presented a ring 4, and

patients XIII and XIV who presented rings 22, revealing no clear correlation between size and ring instability. Our data are in accordance with Kistenmacher and Punnett [25], who stated that behavioral and structural instability of a ring is a function of its genetic content rather than its initial size. The most important factor affecting the phenotype of patients with ring chromosome is the chromosome involved in the rearrangement and the extension of the deletion of genome segments that contain crucial genes for a normal development. Thus, each patient will present their own phenotypic features considering the genes deleted from one or both chromosome arms. We observed that none of the ring chromosomes described in the patients from our sample has similar breakpoints, same those are formed by the same chromosome. Probably there is no specific hot-point in the chromosomes more favorable to these breaks and reunion, that resulting in the ring. Some characteristics, such as delay growth, are usually associated with any autosome ring chromosome, possibly due to ring instability [19,26]. But in patients with r(15) the growth delay is more severe and evident when *IGF1R* (insulin-like growth factor 1 receptor precursor) gene, located in 15q26.3, is lost, as observed in our patient with r(15). Similarly, our patient with r(4) presented severe intrauterine growth delay, a feature usually found in the del (4p) syndrome but not in the del (4q) syndrome. Thus, stature is not related just with the instability of the ring, but also correlates with the haploinsufficiency of stature related genes.



Another factor that could influence the phenotype is the configuration of the ring chromosome that could change the gene expression and cause clinical abnormalities [15,27,28], as observed in our patients VII and XII who presented complete rings without deletion. Another

interesting observation is that patients III and X present certain features associated to genes not deleted in the ring chromosomes. Patient III with r(10) presents bilateral cryptorchidism and vesico-urethral reflux although he has no deletion of *RET*, *PAX2*, *FGFR2*, *GFRA1* and

Table 1 Distribution of metaphases obtained from 72-hour cultures of peripheral blood lymphocytes, according to the number of chromosomes and the presence of secondary aberrations derived from the ring chromosomes.

Patients Metaphases	I r(3)	II r (4)	III r (10)	IV r (10)	V r (13)	VI r (13)	VII r (14)	VIII r (15)	IX r (18)	X r (18)	XI r (18)	XII r (22)	XIII r (22)	XIV r (22)
46 chromosomes with a ring	262	287	251	253	271	264	260	277	268	275	272	276	288	285
45 chromosomes without ring	19	5	38	33	12	19	35	11	17	17	20	15	11	13
Secondary aberrations	19	8	11	14	17	17	5	12	15	8	8	9	1	2
Total	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Percentage of cells with secondary aberrations and without the ring (%)	12.7	4.3	16.3	15.7	9.6	12.0	13.3	7.7	10.7	8.3	9.3	8.0	4.0	5.0

Table 2 Cytogenetic and molecular findings in patients with ring chromosomes.

Patient	Karyotype	Genomic imbalance	Subtel MLPA	Pantel FISH
I	46,XY,r(3)(p26.1q29).arr 3p26.3p26.1(307,820-6,045,520) ×1	del 3p: 5.7 Mb	3p- 3q+	-
II	46,XX,r(4)(p16.3q35.2).arr 4p16.3(449,000-1,827,772) ×1	del 4p: 1.3 Mb	4p- 4q+	-
III	46,XY,r(10)(p15.3q26.2).arr 10q26.2q26.3(127,589,040-135,056,940) ×1	del 10q: 7.4 Mb	10p+ 10q-	+
IV	46,XX,r(10)(p15.3q26.13).arr 10p15.3(158,900-979,500) × 1, 10q26.13q26.3 (126,660,267-135,374,720) × 1	del 10p: 820 Kb del 10q: 8.6 Mb	10p- 10q-	
V	46,XY,r(13)(p13q33.1).arr 13q33.1(101,543,509-103, 001,462) ×3,13q33.1q34(103,003,268-114,142,980) ×1	dup 13q: 1.5 Mb del 13q: 11.1 Mb	"13p"+ 13q-	
VI	46,XY,r(13)(p13q34).arr 13q21.33q34(70,141,036-113, 656,958) ×3,13q34(113,759,040-114,123,122) ×1	dup 13q:43.5Mb del 13q: 364 Kb	"13p"+ 13q-	
VII	46,XY,r(14) (p13q32.33).arr (14) ×2	no deletion	"14p"+ 14q+	-
VIII	46,XX,r(15)(p13q26.2).arr 15q26.2q26.3(94,810,000-100,338,900) ×1	del 15q: 5.5 Mb	"15p"+ 15q-	
IX	46,XY,r(18)(p11.32q22.2).arr 18p11.32p(20-1,377,020) × 1,18q22.2q23(65,015,880-75,849,120) ×1	del 18p: 1.3 Mb del 18q: 11.1 Mb	18p- 18q-	
X	46,XX,r(18)(p11.32q21.33).arr 18q21.33q23(57,446,374-76,117,140) ×1	del 18q: 18.6 Mb	18p+ 18q-	+
XI	46,XX,r(18)(p11.21q23).arr 18p11.32p11.21(178,680-15, 545,050) ×1,18q23(74,427,840-76,027,800) ×1	del 18p: 15.3 Mb del 18q: 1.7 Mb	18p- 18q-	
XII	46,XX,r(22)(p13q13.33).arr (22) ×2	no deletion	"22p"+ 22q+	+
XIII	46,XY,r(22)(p13q13.2).arr 22q13.2q13.33(42,437,109-49,562,479) ×1	del 22q: 7.1 Mb	"22p"+ 22q-	
XIV	46,XX,r(22)(p13q13.2).arr 22q11.21(17,257,787-18,710, 895) ×1,22q13.2q13.33(41,744,274-49,562,479) ×1	del 22q: 1.4 Mb del 22q: 7.8 Mb	"22p"+ 22q-	

Subtel MLPA: MLPA with subtelomeric probes; Pantel FISH: FISH signals on ring chromosomes obtained with pantelomeric probes; (-): absent; (+): present; (" "): for acrocentric chromosomes, probes are located proximally on their long arms.

EMX2 genes mapped in 10q, postulated as candidate genes for urinary and/or genital development [29]. Also, our patient with r(14) presented seizures and hypopigmented area in posterior pole in both eyes, which are features commonly found in individuals with a ring 14 and have been attributed to genes proximally located on 14q11q13 and q32.2, respectively [15,21,30]. Castermans et al [31] reported a patient with autism and coloboma, in which the ring formation was associated with silencing of the *AMISYN* gene, located near the breakpoint, also suggesting that the position effect can have clinical consequences possibly due to gene silencing.

From the recent discovery that ring chromosomes can present duplicated genomic segments [7,8], phenotypic correlation in ring patients cannot be done by assuming a simple deletion without excluding the detection of additional duplicated segments. Terminal deletions were found to be associated to duplications near the breakpoint in our patients V and VI who present not only the features found in deletion 13 and r(13) syndromes but a variable clinical picture related to the size of the duplication. Thus, this mechanism inv-dup-del of ring formation has important implications for the phenotype, since

these ring chromosomes result not only in partial monosomy but also in partial trisomy.

Conclusions

In light of all these findings, we concluded that the large spectrum of symptoms and their severity in patients with ring chromosomes can be attributed to different factors. Besides the deletion in one or in both chromosome arms occurring in ring formation, the resultant secondary genetic imbalance due to ring instability and epigenetic factors need also to be taken into account in the evaluation of the genetic consequences and in the attempt to reach a better understanding of the genotype-phenotype correlations.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, Brazil (grant to M.L.M. #07/58735-5). We are grateful to Dr. Decio Brunoni, Marco Antonio de Paula Ramos, Benjamin Heck, Silvia Bragagnolo and Luis Garcia Alonso for referring patients for this study

Author details

¹Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, Botucatu Street 740, Zip Code 04023-900, São Paulo, Brazil. ²Genetics Unit, Instituto da Criança, University of São Paulo, Avenue

Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 647, Zip Code 05403-000, São Paulo, Brazil.
³Department of Psychobiology, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu, 740, Zip Code 04023-900, São Paulo, Brazil. ⁴Division of Human Genetics and Molecular Biology, Children's Hospital of Philadelphia, 34th Street and Civic Center Boulevard, Pa 19104, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
⁵Gynecology and Obstetrics Division, School of Medicine of ABC, Avenue Príncipe de Gales 821, Zip Code 09060-650, São Paulo, Brazil. ⁶Department of Pathology, LIM 03, University of São Paulo, Avenue Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 647, Zip Code 05403-000, São Paulo, Brazil.

Authors' contributions

RSG performed cytogenetic and FISH studies and wrote the paper. VFAM and CAK carried out the data clinical of the patients. RP performed SNP array using the Affymetrix platform and analyzed the results. SST performed cytogenetic studies. NBS and LKC performed SNP array using the Illumina platform and analyzed the results. DMC performed MLPA study and analyzed the results. LDK and MIM coordinated the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 August 2011 Accepted: 21 December 2011

Published: 21 December 2011

References

1. Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW, Geraghty MT: **Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome.** *Am J Med Genet* 1999, **87**:384-390.
2. Conlin LK, Kramer W, Hutchinson AL, Li X, Riethman H, Hakonarson H, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF, Hosain SA, et al: **Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients.** *J Med Genet* 2011, **48**:1-9.
3. Henegariu O, Kernek S, Keating MA, Palmer CG, Heerema NA: **PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome.** *A J Med Genet* 1997, **69**:171-176.
4. Vermeesch JR, Baten E, Frys JP, Devriendt K: **Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences.** *Clin Genet* 2002, **62**:415-417.
5. Le Caignec C, Boceno M, Jacquemont S, Nguyen The Tich S, Rival JM, David A: **Inherited ring chromosome 8 without loss of subtelomeric sequences.** *Ann Genet* 2004, **47**:289-296.
6. Seghezzi L, Maraschio P, Bozzola M, Maserati E, Tupler R, Marchi A, Tiepolo L: **Ring chromosome 9 with a 9p22.3-p24.3 duplication.** *Eur J Pediatr* 1999, **158**:791-793.
7. Knijnenburg J, van Haeringen A, Hansson KB, Lankester A, Smit MJ, Belfroid RD, Bakker E, Rosenberg C, Tanke HJ, Szuhai K: **Ring chromosome formation as a novel escape mechanism in patients with inverted duplication and terminal deletion.** *Eur J Hum Genet* 2007, **15**:548-555.
8. Rossi E, Riegel M, Messa J, Gimelli S, Maraschio P, Ciccone R, Stroppi M, Riva P, Perrotta CS, Mattina T, et al: **Duplications in addition to terminal deletions are present in a proportion of ring chromosomes: clues to the mechanisms of formation.** *J Med Genet* 2008, **45**:147-154.
9. McGinniss MJ, Kazazian HH, Stetten G, Petersen MB, Boman H, Engel E, Greenberg F, Hertz JM, Johnson A, Laca Z, et al: **Mechanisms of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21.** *Am J Hum Genet* 1992, **50**:15-28.
10. Schinzel A: *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man* Berlin: Walter de Gruyter; 2001.
11. Turner Z, Harboe TL, Blennow E, Kalscheuer VM, Tommerup N, Brondum-Nielsen K: **Molecular cytogenetic characterization of ring chromosome 15 in three unrelated patients.** *Am J Med Genet A* 2004, **130**:340-344.
12. Purandare SM, Lee J, Hassed S, Steele MI, Blackett PR, Mulvihill JJ, Li S: **Ring chromosome 9 [r(9)(p24q34)]: a report of two cases.** *Am J Med Genet A* 2005, **138**:229-235.
13. Glass IA, Rauen KA, Chen E, Parkes J, Alberston DG, Pinkel D, Cotter PD: **Ring chromosome 15: characterization by array CGH.** *Hum Genet* 2006, **118**:611-617.
14. Hockner M, Utermann B, Erdel M, Fauth C, Utermann G, Kotzot D: **Molecular characterization of a de novo ring chromosome 6 in a growth**

retarded but otherwise healthy woman. *Am J Med Genet A* 2008, **146**:925-929.

15. Zollino M, Seminara L, Orteschi D, Gobbi G, Giovannini S, Della Giustina E, Frattini D, Scarano A, Neri G: **The ring 14 syndrome: clinical and molecular definition.** *Am J Med Genet A* 2009, **149**:1116-1124.
16. Niss R, Passarge E: **Derivative chromosomal structures from a ring chromosome 4.** *Humangenetik* 1975, **28**:9-23.
17. Ledbetter DH, Riccardi VM, Au WW, Wilson DP, Holmquist GP: **Ring chromosome 15: phenotype, Ag-NOR analysis, secondary aneuploidy, and associated chromosome instability.** *Cytogenet Cell Genet* 1980, **27**:111-122.
18. Fang YY, Eyre HJ, Bohlander SK, Estop A, McPherson E, Trager T, Riess O, Callen DF: **Mechanisms of small ring formation suggested by the molecular characterization of two small accessory ring chromosomes derived from chromosome 4.** *Am J Hum Genet* 1995, **57**:1137-1142.
19. Kosztolanyi G: **The Genetics and Clinical Characteristics of Constitutional Ring Chromosomes.** *J Assoc Genet Technol* 2009, **35**:44-48.
20. Sodre CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, Belanger SI, Christofolini DM, Kulikowski LD, Melaragno MI: **Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings.** *Genet Mol Res* 2010, **9**:134-143.
21. Guilherme RS, Meloni VFA, Sodre CP, Christofolini DM, Pellegrino R, de Mello CB, Conlin LK, Hutchinson AL, Spinner NB, Brunoni D, et al: **Cytogenetic and molecular evaluation and 20-year follow-up of a patient with ring chromosome 14.** *Am J Med Genet A* 2010, **152**:2865-2869.
22. Guilherme RS, Bragnolo S, Pellegrino R, Christofolini DM, Takeno SS, Carvalheira GM, Kulikowski LD, Melaragno MI: **Clinical, cytogenetic and molecular study in a case of r(3) with 3p deletion and review of the literature.** *Cytogenetic and genome research* 2011, **134**(4):325-330.
23. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS: **A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology.** *Nature Genetics* 2005, **37**:549-554.
24. Kosztolanyi G: **Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome.** *Hum Genet* 1987, **75**:174-179.
25. Kistenmacher ML, Punnett HH: **Comparative behavior of ring chromosomes.** *Am J Hum Genet* 1970, **22**:304-318.
26. Frizzley JK, Stephan MJ, Lamb AN, Jonas PP, Hinson RM, Moffitt DR, Shkolny DL, McDermid HE: **Ring 22 duplication/deletion mosaicism: clinical, cytogenetic, and molecular characterisation.** *J Med Genet* 1999, **36**:237-241.
27. Schlade-Bartusiak K, Costa T, Summers AM, Nowaczyk MJ, Cox DW: **FISH-mapping of telomeric 14q32 deletions: search for the cause of seizures.** *Am J Med Genet A* 2005, **138**:218-224.
28. Ville D, de Bellescize J, Nguyen MA, Testard H, Gautier A, Perrier J, Till M, V des Portes V: **Ring 14 chromosome presenting as early-onset isolated partial epilepsy.** *Dev Med Child Neurol* 2009, **51**:917-922.
29. Ogata T, Muroya K, Sasagawa I, Koshio T, Wakui K, Sakazume S, Ito K, Matsuo N, Ohashi H, Nagai T: **Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26.** *Kidney Int* 2000, **58**:2281-2290.
30. Howard PJ, Clark D, Dearlove J: **Retinal/macular pigmentation in conjunction with ring 14 chromosome.** *Hum Genet* 1988, **80**:140-142.
31. Castermans D, Thienpont B, Volders K, Crepel A, Vermeesch JR, Schrandt-Stumpel CT, Van de Ven WJ, Steyaert JG, Creemers JW, Devriendt K: **Position effect leading to haploinsufficiency in a mosaic ring chromosome 14 in a boy with autism.** *Eur J Hum Genet* 2008, **16**:1187-1192.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/171/prepub

doi:10.1186/1471-2350-12-171

Cite this article as: Guilherme et al: Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Medical Genetics* 2011 **12**:171.

Apêndice 3 Guilherme et al., 2014.

Guilherme et al. *BMC Medical Genetics* (2014) 15:142
DOI 10.1186/s12881-014-0142-1



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Duplication 9p and their implication to phenotype

Roberta Santos Guilherme¹, Vera Ayres Meloni¹, Ana Beatriz Alvarez Perez¹, Ana Luiza Pilla¹, Marco Antonio Paula de Ramos¹, Anelisa Gollo Dantas¹, Sylvia Satomi Takeno¹, Leslie Domenici Kulikowski² and Maria Isabel Melaragno^{1*}

Abstract

Background: Trisomy 9p is one of the most common partial trisomies found in newborns. We report the clinical features and cytogenomic findings in five patients with different chromosome rearrangements resulting in complete 9p duplication, three of them involving 9p centromere alterations.

Methods: The rearrangements in the patients were characterized by G-banding, SNP-array and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with different probes.

Results: Two patients presented *de novo* dicentric chromosomes: der(9;15)t(9;15)(p11.2;p13) and der(9;21)t(9;21)(p13.1;p13.1). One patient presented two concomitant rearranged chromosomes: a der(12;9)t(9;12)(q21.13;p13.33) and an psu i(9)(p10) which showed FISH centromeric signal smaller than in the normal chromosome 9. Besides the duplication 9p24.3p13.1, array revealed a 7.3 Mb deletion in 9q13q21.13 in this patient. The break in the psu i(9)(p10) probably occurred in the centromere resulting in a smaller centromere and with part of the 9q translocated to the distal 12p with the deletion 9q occurring during this rearrangement. Two patients, brother and sister, present 9p duplication concomitant to 18p deletion due to an inherited der(18)t(9;18)(p11.2;p11.31)mat.

Conclusions: The patients with trisomy 9p present a well-recognizable phenotype due to facial appearance, although the genotype-phenotype correlation can be difficult due to concomitant partial monosomy of other chromosomes. The chromosome 9 is rich in segmental duplication, especially in pericentromeric region, with high degree of sequence identity to sequences in 15p, 18p and 21p, chromosomes involved in our rearrangements. Thus, we suggest that chromosome 9 is prone to illegitimate recombination, either intrachromosomal or interchromosomal, which predisposes it to rearrangements, frequently involving pericentromeric regions.

Keywords: 9p duplication, Trisomy 9p, Centromere, FISH, SNP-array, Karyotype-phenotype correlation

Background

Since the report of a 9p duplication by Rethore *et al.* [1], more than 150 patients have been reported in the literature. Trisomy 9p, together with trisomy 21, 18 and 13 are the most common trisomies found in newborns. A possible explanation might be that 9p chromosome is relatively poor in genes and therefore more compatible with survival [2]. In general, there is a remarkable consistency in the phenotype, especially in facial and digital anomalies, despite of variations in the size of the duplication [3,4]. Other features include short stature, microcephaly/brachycephaly, downslanting palpebral fissures, deep set eyes,

hypertelorism, short wide neck, globular/prominent nose, short philtrum, downturned corners of the mouth, low set ears, development delay, anomalies of hands and toes and variable degree of intellectual disability [3,5-7]. Trisomy for 9pter → p11 is associated with typical craniofacial features, while trisomy for 9pter → q11-13 shows skeletal and cardiac defects in addition to the craniofacial features [8]. The degree of clinical severity is related to the extension of the 9p duplicated segment [5] but phenotype-genotype correlation studies suggested that the minimal critical region for the classical trisomy 9p is located in 9p22 → p24 [7,9] while Christ *et al.* [10] proposed a shorter region 9p22.1 → p23.

In most cases partial 9p trisomy was the result of parental reciprocal translocations between chromosome 9 and another autosome [11]. Direct 9p duplication was reported

* Correspondence: melaragno.maria@unifesp.br

¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, CEP 04023-900 São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Guilherme et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

only in a few papers [12]. Thus, in the majority of cases, phenotypic heterogeneity occurs due to the variable size of the duplicated segment and the frequent concomitant monosomy or other chromosome segment [11].

We report five patients (two of them siblings) with four different 9p duplications and three of them involving the centromere of chromosome 9. Two patients present pure duplication, one presents 9p duplication associated with 9q deletion and two patients inherited the derivative chromosome from a maternal translocation and both present an 18p deletion associated with the 9p duplication.

Clinical report

Patient 1 (P1)

Male, unique son from a young non-consanguineous couple and born by cesarean section. At birth, his measurements were: weight of 2,030 g (<3rd centile) and length of 48 cm (15 th centile) and unknown head circumference. At 7 years, his height of 118.5 cm (3rd centile), weight was 23,7 Kg (50 th centile) and head circumference of 47.5 cm (<3rd centile). The clinical evaluation revealed: microcephaly, downslanting palpebral fissures, bilateral microtia, broad and prominent nose, bulbous nasal tip, short philtrum, high palate, scoliosis, bilateral clinodactyly of the 5 th finger, short median phalanges, dystrophic nails in feet and micropenis (Figure 1a). At 17 years and nine months, his height 161.5 of cm (3rd centile); weight was 54,8 Kg, BMI (Body Mass Index) of 21 (15th-50th centile) and head circumference of 51 cm (<3rd centile). He evolved with neuropsychomotor delay and presents with moderated intellectual disability and hipotonia.

Patient 2 (P2)

Female, second child of a young and non-consanguineous couple. She was born by cesarean section. At birth, her measurements were: weight of 2,400 g (3rd centile), length of 49 cm (50th centile) and unknown head circumference. At 6 years, her weight was 22 kg (75th centile), height of 118 cm (50th centile) and head circumference of 51 cm

(50 th centile). The clinical evaluation revealed: brachycephaly, wide forehead, triangular face, low-set ears, broad and prominent nasal bridge, ocular hypertelorism, short philtrum, conchal shelf ears, high and narrow palate, mamarian hypertelorism, bilateral shortening of 2 th finger in hands, bilateral clynodactyly of 5 th fingers in hands, and flat feet (Figure 1b). She evolved with neuropsychomotor delay and recurrent infections.

Patient 3 (P3)

Female, unique child of a young and non-consanguineous couple. She was born at term by cesarean section after an uneventful pregnancy. At birth, her measurements were: weight 2,620 g (15 th - 50 th centile), length of 49 cm (50 th centile) and head circumference of 32.5 cm (3rd - 15 th centile). At one year, her length was 67 cm (10 th centile), weight was 6,300 g (<3rd centile) and head circumference was 44.5 cm (3rd centile). The clinical evaluation revealed: brachycephaly, wide fontanelles, wide forehead, flattened face, ocular hypertelorism, inversus epicanthus, exotropia, low-set and conchal shelf ears, short nose, long philtrum, kyphosis, brachydactyly, and ungueal hypoplasia. At six years and nine months, her length was 99 cm (<3rd centile), weight was 13,950 g (<3rd centile) and head circumference was 51 cm (50 th centile). The renal ultrasonography showed bilateral renal hypoplasia and the cranial MRI (Magnetic Resonance Imaging) scan revealed mild cranial asymmetry. She evolved with hypotonia, neuropsychomotor delay and seizures (Figure 1c).

Patient 4 (P4)

Male, first child of a young non-consanguineous couple. His mother is carrier of a balanced translocation and had three pregnancies, one of them an abortion. He was born by cesarean section with birth weight of 3,640 g (15 th - 50 th centile), birth length of 48 cm (15 th centile) and unknown head circumference. At 17 years and three months, the clinical evaluation revealed: height of 163.5 cm (5 th centile); weight of 60 kg, Substitute body mass index by BMI of 22.22 (50 th-75 th centile) and

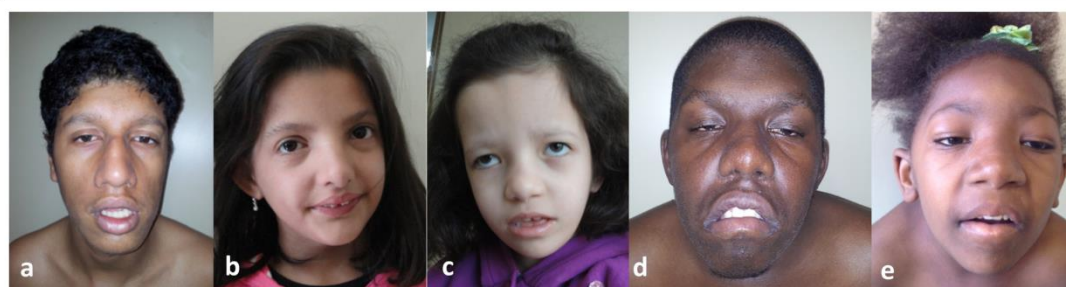


Figure 1 Patients 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) and 5 (e) at age 14, 5, 7, 17 and 8, respectively.

head circumference of 53.5 cm (3rd centile). The clinical evaluation revealed: brachycephaly, coarse face, prominent forehead, ocular hypertelorism, downslanting palpebral fissures, bilateral ptosis, epicanthal folds, prominent nasal bridge, bulbous nasal tip, short philtrum, low set ears, thick lips, downturned corners of the mouth, short and webbed neck, kyphoscoliosis, cryptorchidism, umbilical hernia, hypermobile joints especially in the fingers, braquidactyly, clinodactyly, short toes and flat feet (Figure 1d). The ophthalmic evaluation detected myopia. He presented with hypotonia, neuropsychomotor development and speech delay, and moderate intellectual disability.

Patient 5 (P5)

Female, sister of patient 4, born by cesarean section with a birth weight of 3,750 g (50 th - 85 th centile); birth length of 49 cm (50 th centile) and unknown head circumference. At six years and seven months, the clinical evaluation revealed: height of 101 cm (<1st centile); weight of 18 kg (15 th centile) and head circumference of 49 cm (3rd centile). The clinical evaluation revealed: proportionate short stature, coarse face, prominent forehead, ocular hypertelorism, exotropia, downslanting palpebral fissures, bilateral ptosis, bilateral epicanthal folds, prominent and large nose, bulbous nasal tip, low set ears, thick lips, large mouth, downturned corners of the mouth, high arched palate, short and webbed neck, kyphoscoliosis, hyperflexible joints especially in the fingers, bilateral clinodactyly of the fifth fingers, short hands and feet, flat feet and dystrophic nails (Figure 1e). The ophthalmic evaluation detected myopia. She presented with hypotonia, neuropsychomotor development and speech delay, and moderate intellectual disability.

Methods

Classical and molecular cytogenetic study

This study was approved by the ethics committee of the University Federal of São Paulo (CEP 0389/11). The parent or guardian of the patients signed the consent form for participation in the study and to publish picture. Chromosome analyses were performed on 72-h lymphocyte cultures for all patients (Table 1) and their parents. We performed G-banding and FISH in order to investigate the rearranged chromosomes. FISH was performed with commercial probes for

centromere of the rearranged chromosomes (Cytocell®) and BAC (Bacterial Artificial Chromosome) probes RP11-143N16 (9p23) and RP11-373I24 (12p13.33) in the patient 3 as previously described [13].

Molecular studies

DNA was isolated from peripheral blood using a Gentra Puregene kit (Qiagen Sciences Inc., Germantown, MD, USA). High-resolution breakpoint mapping was performed using Cytoscan HD (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were analyzed using the Chromosome Analysis Suite (ChAS) software and annotation GRCh37/hg19.

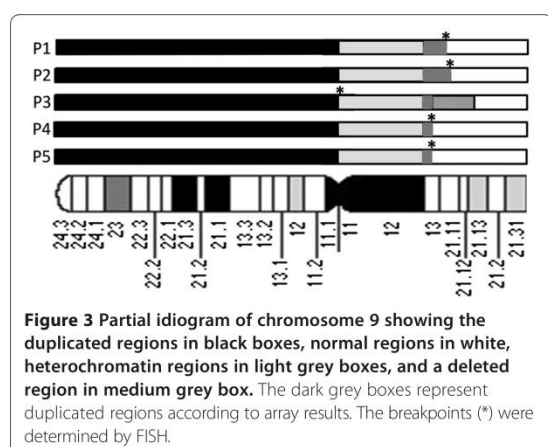
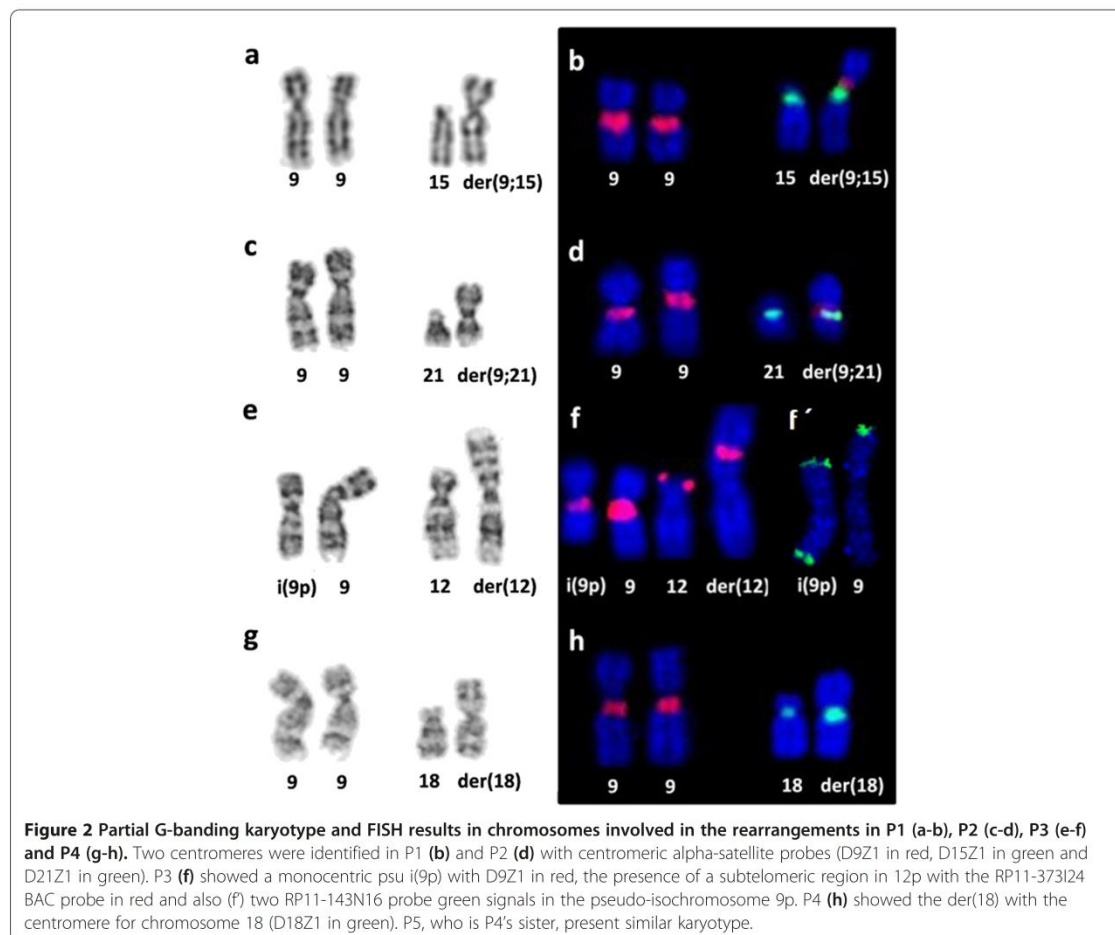
Results

Three patients present *de novo* duplications (P1 to P3), while two patients - brother and sister (P4 and P5), present the abnormality inherited from the mother, who has a balanced translocation (Table 1). G-banding and FISH revealed a der(9;15) with centromeres from both chromosomes in P1 (Figure 2a-b), a der(9;21) with also centromeres from both chromosomes in P2 (Figure 2c-d), a pseudo-isochromosome 9p with a small centromere and a der(12)t(9;12) with no deletion in 12p in P3 (Figure 2e, f and f'). P4 and P5 presented a maternal der(18)t(9;18) with a normal chromosome 18 centromere (Figure 2g-h).

Array results (Table 1) revealed complete 9p duplication in all patients. However, patient 3 presented a duplication followed by deletion 9q13 → q21.13, and patients 4 and 5 presented a concomitant 18p deletion due to an unbalanced translocation between chromosomes 9 and 18. Array showed three copies from 9p to proximal 9q in all patients (Figure 3). However, since array presents no probes in the pericentromeric 9p region and its flanking regions are CNVs (Copy Number Variation) rich, we interpreted the breakpoint as being located at 9q21.11 for P1 and P2, considering that both derivative chromosomes are dicentric. For P3, the pseudo-isochromosome 9p presents a fainter FISH signal suggesting the breakpoint within the centromere region. This patient also presents part of the long arm translocated to 12p. For P4 and P5, the breakpoint was mapped at 9p11.1 since FISH does not showed centromeric 9p signal in the derivative chromosome 18 indicating that the break not

Table 1 Cytogenomic results for patients with 9p duplication

Patient	Cytogenomic data
1	46,XY,der(9;15)t(9;15)(q21.11;p11.2).arr 9p24.3q21.11 (46,586-69,978,010) × 3
2	46,XX,der(9;21)t(9;21)(q21.11;p11.2).arr 9p24.3q21.11 (203,861-70,990,047) × 3
3	46,XX,psu i(9)(p10),der(12)t(9;12)(q21.13;p13.33).arr 9p24.3q13(203,861-68,359,990) × 3, 9q13q21.13(68,665,170-76,027,242) × 1
4	46,XY,der(18)t(9;18)(p11.1;p11.31).matarr 9p24.3q13(203,861-68,139,972) × 3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936) × 1
5	46,XX,der(18)t(9;18)(p11.1;p11.31).matarr 9p24.3q13(203,861-68,139,972) × 3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936) × 1



occurred in the centromere of the chromosome 9. Combining all cytogenomic results, we could characterize the derivative chromosomes as shown in Table 1.

Discussion

Trisomy 9p is a well-recognizable clinical entity and the facial appearance of patients usually leads to considering the diagnosis [14]. In general, determining the genotype-phenotype correlation is often difficult by the presence of concomitant partial monosomy of other chromosome. We found two patients with pure trisomy 9p (P1 and P2), one with concomitant interstitial deletion 9q (P3) and two with trisomy 9p associated with terminal 18p deletion (P4 and P5).

Table 2 shows the patients reported in the literature in which the breakpoints were determined precisely with high resolution techniques. The clinical characteristics more frequently observed in patients with partial and

Table 2 Clinical features and chromosome breakpoints in patients with partial and complete 9p duplication defined by FISH or array

Features		Authors																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	P1	P2	P3	P4	P5
9p duplication	9p22 →	9p22 →	9p22 →	9p22 →	9p22 →	9p22 →	9p24 →	9p24 →	9p24 →	9p22.3 →	9p24 →	9p21.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →	9p24.3 →
	p24 →	p24 →	p24 →	p24 →	p24 →	p24 →	p24 →	p12 →	p12 →	p23 →	9q21 →	9p13.2 →	9p13.1 →	9p13.1 →	p11.2 →	p13.1 →	*del9q13 →	11.31 →	32p11.31 →
	9 y (girl)	44 y (father)	9 m (boy)	19 m (boy)	14 y (boy)	6 y (boy)	10 m (boy)	1 m (girl)	6 y (girl)	At birth (girl)	12 y (girl)	15 m (girl)	13 y (girl)	13 y (girl)	14 y (boy)	6 y (girl)	6 y (girl)	17 y (boy)	6y (girl)
	P1	P2																	
Microcephaly			+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	-	-	-	-
Brachycephaly								+	+							+	+	+	+
Epicanthal folds			+		+			+					+				+	+	+
Micrognathia						+	+	+							+	+		-	-
Downslanting palpebral fissures	+		+	+	+	+	+		+						+		+	+	+
Prominent/large nose	+	+	+	+	+		+								+	+	+	+	+
Bulbous nasal tip						+	+	+	+		+		+		+		+	+	+
Deep set eyes	+			+	+	+	+	+	+			+			+		+	-	-
Hypertelorism		+		+			+	+					+		+	+	+	+	+
Low set ears			+	+	+	+	+		+	-			+			+	+	+	+
Malformed ears			+		+	+				-						+	+		
Downturned corners of the mouth			+			+		+	+	-			+					+	+
Thin upper lip	+	+					+	+					+					-	-
Short neck		+		+	+	+	+	+	+		+	+					+	+	+
Fifth finger short			+	-													+		
Nail hypoplasia			-	-	+	+	+	+		+					+		+	+	+
Clinodactyly	+	+		-	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Brachydactyly	+	+								+			+		+	+	+		
Neuropsychomotor development delay	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypotonia			+	+											+		+	+	+
Growth delay		+	+		+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Small penis						+									+				
Speech delay						+	+				+	+	+	+			+	+	+
1-2) Haddad et al. 1996 [9]; (3) Fujimoto et al. 1998 [7]; (4) Guanciali-Franchi et al. 2000 [12]; (5) de Pater et al. 2002 [4]; (6) Sanlaville et al. 1999 [31]; (7) Tsezou et al. 2000 [3]; (8) Teraoka et al. 2001 [8]; (9) Bonaglia et al. 2002 [17]; (10) Morrissette et al. 2003 [30]; (11) Zou et al. 2009 [15]; (12) Abu-Amro et al. 2010 [16]; (13) Chen et al. 2011 [18]; (14-17) Our patients (P1, P2, P3, P4 and P5); (+) present; (-) absent; () not mentioned in the paper * (additional deletion).																			

(1-2) Haddad et al. 1996 [9]; (3) Fujimoto et al. 1998 [7]; (4) Guanciali-Franchi et al. 2000 [12]; (5) de Pater et al. 2002 [4]; (6) Sanlaville et al. 1999 [31]; (7) Tsezou et al. 2000 [3]; (8) Teraoka et al. 2001 [8]; (9) Bonaglia et al. 2002 [17]; (10) Morrisette et al. 2003 [30]; (11) Zou et al. 2009 [15]; (12) Abu-Amero et al. 2010 [16]; (13) Chen et al. 2011 [18]; (14-17) Our patients (P1, P2, P3, P4 and P5); (+) present; (-) absent; () not mentioned in the paper * (additional deletion).

complete 9p duplication include prominent and large nose, bulbous nasal tip, low set ears, short neck, clinodactyly, neuropsychomotor development delay and speech delay. Some other characteristics are rarely reported, such as strabismus (our P1, P2, P3 and P5), myopia ([15], our P4 and P5), heart disease [9], epilepsy ([16] and our P3), dolichocephaly [17], self-injurious behavior [18] and mild cubitus valgus [15]. The patient described by Bonaglia *et al.* [17] presented average intellectual capability and cognitive functions, dolichocephaly, crowded teeth and high arched palate.

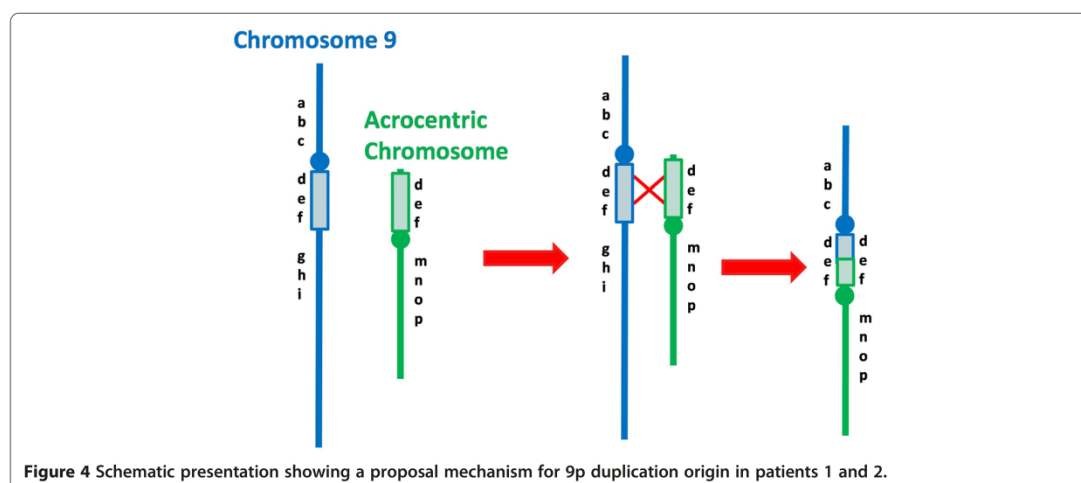
Based on the UCSC Genome Browser database (<https://genome.ucsc.edu>), the duplicated region in our patients contains several annotated genes. *DMRT1* (doublesex- and mab-3-related transcription factor 1) and *DMRT2* (doublesex- and mab-3-related transcription factor 2) are genes related to gonadal development causing hypospadias, abnormal external genitalia, or XY sex reversal, as well as gonadal dysgenesis [19–21]. Only our male patients (P1 and P4) presented gonadal malformation. *FREMI* (FRAS1-related extracellular matrix 1) gene encodes a basement membrane protein that may play a role in craniofacial and renal development. Although none of our patients presented renal abnormality, P1 presented microcephaly and P2, P3 and P4 present brachycephaly. *PSIPI* (PC4 and SFRS1 interacting protein 1), *SIGMAR1* (Sigma non-opioid intracellular receptor 1), *PAX5* (paired box 5) and *CNTNAP3* (contactin associated protein-like 3) genes are involved in the development of central nervous system and are responsible for learning processes, memory and mood alteration. All of our patients presented intellectual disability. Deletion of *FOXD4* (forkhead box D4) gene is associated with speech and language delays [22] as found in eight patients from Table 2. The genes described above cause abnormalities when deleted or mutated. However, in our patients, these genes are present in three copies, probably resulting in overexpression of these genes causing impairment of its function. It is possible that some of the duplicated genes are dosage-sensitive gene and the interaction with other factors, such as regulatory elements (transcription factors and growth factors), may contribute to phenotype and cerebral malformation. In fact, the phenotypic heterogeneity in trisomy 9p can be caused by the variable expression of duplicated genes, which can change the development phenotype [23].

The patient 3 presented a concomitant 9q13-q21.13 deletion which includes genes associated with skeletal muscle and kidney development such as *PGM5* (phosphoglucomutase 5), *PIP5K1B* (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta) and *ZFAND5* (zinc finger, AN1-type domain 5) that may be responsible for her hypotonia and kidney alteration. The concomitant

18p deletion in the patients 4 and 5 includes genes associated with muscle cell elastic fibers involved in regulation of contractile activity such as *EMILIN2* (elastin microfibril interfacer 2), *MYOM1* (myomesin 1) and *MYL12B* (myosin, light chain 12B), probably responsible for their hyperlaxity, hiperextensible fingers and hyperflexible joints.

In most patients, the 9p duplicated segment is derived from a parental reciprocal balanced translocation and is accompanied by a concurrent deletion of another chromosome, such as in our patients 3 to 5, who additionally to the 9p duplication, presented a deletion. For P4 and P5, the deletion seems to be more relevant to their clinical features causing short stature, microcephaly, round face, ptosis and downslanting palpebral fissures. Pure *de novo* duplications of 9p - as in our patients 1 and 2 - are rare, and there are only 15 patients reported [16].

The pericentromeric region of chromosome 9 is especially rich in segmental duplications or low copy repeats (LCR) that predispose it to non-allelic homologous recombination (NAHR) resulting in a high frequency of polymorphic variants located adjacent to the centromere [24], with pericentric inversions (49.4%) being the most frequent alterations [25]. In order to explain our rearranged chromosomes 9, we must consider that at least 5% of the human genome consists of interspersed duplications, either between non-homologous chromosomes (transchromosomal duplications), or restricted to a particular chromosome (chromosome-specific duplications) (Eichler, 2001). In our cases P1 and P2 the unequal recombination between nonhomologous chromosomes would have probably originated 9p duplication that rearranged with other chromosome by NHEJ (nonhomologous end-joining) mechanism possibly due to homology between the breakpoints. Among the interchromosomal segmental duplications, there are some in chromosome 9 with high degree of sequence identity at the nucleotide level DNA to sequences in the pericentromeric region of the short arm of chromosomes 15, 18 and 21, the chromosomes involved in our rearrangements [26–28]. Thus, we suggest that these interchromosomal segmental duplications located in chromosome 9 within the pericentromeric inversion variant, and within the pericentromeric sequences of nonhomologous chromosomes predisposed to illegitimate recombination between them, resulting in the dicentric chromosomes in our P1 and P2 with 9p duplication (Figure 4). These chromosomes may be converted into a stable functional monocentric chromosome by epigenetic centromere inactivation followed by heterochromatinization, which suppresses the revival of centromere activity, as proposed by Sato *et al.* [29] in chromosomes in yeast.



P3 presents a pseudo-isochromosome 9p with a smaller centromere than its homologous, suggesting that the break occurred in the centromere. Probably the deletion 9q (P3) resulted from an error during the translocation with chromosome 12. Patients P4 and P5 inherited a derivative chromosome 18 from their mother. Littooij *et al.* [11] suggested that the relatively high frequency of partial trisomy 9p is not the result of an increased frequency of recombination events due to breakage sensitive regions on 9p, but rather the result of postmeiotic survival of relatively viable zygotes.

FISH was essential to define the rearrangement around the centromeric region of chromosome 9 because arrays do not present probes for the heterochromatin region due to high level of repetitive elements. Moreover, there is a copy number variation around this region making it difficult to interpret the array data. We believe that 9p duplication associated to dicentric chromosomes must be a much more common event than thought since many reported rearranged chromosomes may be insufficiently characterized.

Conclusion

The patients with trisomy 9p present a well-recognizable phenotype, however the genotype-phenotype correlation can be difficult due to concomitant partial monosomy of other chromosomes, and the possibility of some of the duplicated genes are dosage-sensitive which may influence the phenotype. The use of microarray together with FISH technology was critical for the proper identification and precise molecular characterization of the rearranged chromosomes in order to better

define the critical regions, leading to more accurate genotype/phenotype correlations and understanding of the mechanisms involved in these genomic imbalances.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RSG performed cytogenetic, FISH studies and wrote the manuscript. VAM, ABAP, ALP and MAPR carried out the data clinical of the patients. AGD and SST analyzed the SNP-array results. LDK and MIM coordinated the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript [30,31].

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP, Brazil (Grant to MIM # 2012/51150-0 and RSG # 2012/15572-7).

Author details

¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, CEP 04023-900 São Paulo, Brazil. ²Department of Pathology, Laboratório de Citogenômica, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 647, CEP 05403-000 São Paulo, Brazil.

Received: 2 June 2014 Accepted: 11 December 2014

Published online: 20 December 2014

References

1. Rethore MO, Larget-Piet L, Abonyi D, Boeswillwald M, Berger R, Carpentier S, Cruveiller J, Dutrillaux B, Lafourcade J, Penneau M, *et al*: **4 cases of trisomy for the short arm of chromosome 9. Individualization of a new morbid entity.** *Ann Genet* 1970, **13**(4):217–232.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, *et al*: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**(5507):1304–1351.
3. Tsezou A, Kitsiou S, Galla A, Petersen MB, Karadima G, Syrrou M, Sahlen S, Blennow E: **Molecular cytogenetic characterization and origin of two de novo duplication 9p cases.** *Am J Med Genet* 2000, **91**(2):102–106.
4. de Pater JM, Ippel PF, van Dam WM, Loneus WH, Engelen JJ: **Characterization of partial trisomy 9p due to insertional translocation by chromosomal (micro)FISH.** *Clin Genet* 2002, **62**(6):482–487.
5. Wilson GN, Raj A, Baker D: **The phenotypic and cytogenetic spectrum of partial trisomy 9.** *Am J Med Genet* 1985, **20**(2):277–282.

6. P N: Compendium of birth defects. Oxford: Blackwell 1991, In: Buyse ML, ed. :355–356.
7. Fujimoto A, Lin MS, Schwartz S: **Direct duplication of 9p22-p24 in a child with duplication 9p syndrome.** *Am J Med Genet* 1998, **77**(4):268–271.
8. Teraoka M, Narahara K, Yokoyama Y, Ninomiya S, Mizuta S, Une T, Seino Y: **Maternal origin of a unique extra chromosome, der(9)(pter-q13;q13-q12) in a girl with typical trisomy 9p syndrome.** *Am J Med Genet* 2001, **102**(1):25–28.
9. Haddad BR, Lin AE, Wyandt H, Milunsky A: **Molecular cytogenetic characterisation of the first familial case of partial 9p duplication (p22p24).** *J Med Genet* 1996, **33**(12):1045–1047.
10. Christ LA, Crowe CA, Micale MA, Conroy JM, Schwartz S: **Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**(5):1387–1395.
11. Littooij AS, Hochstenbach R, Sinke RJ, van Tintelen P, Giltay JC: **Two cases with partial trisomy 9p: molecular cytogenetic characterization and clinical follow-up.** *Am J Med Genet* 2002, **109**(2):125–132.
12. Guanciali Franchi P, Calabrese G, Morizio E, Modestini E, Stuppia L, Mingarelli R, Palka G: **FISH analysis in detecting 9p duplication (p22p24).** *Am J Med Genet* 2000, **90**(1):35–37.
13. Kulikowski LD, Bellucco FT, Nogueira SI, Christofolini DM, Smith Mde A, de Mello CB, Brunoni D, Melaragno MI: **Pure duplication 1q41-qter: further delineation of trisomy 1q syndromes.** *Am J Med Genet A* 2008, **146A**(20):2663–2667.
14. Concolino D, Cinti R, Moricca M, Andria G, Strisciuglio P: **Centric fission of chromosome 9 in a boy with trisomy 9p.** *Am J Med Genet* 1998, **79**(1):35–37.
15. Zou YS, Huang XL, Ito M, Newton S, Milunsky JM: **Further delineation of the critical region for the 9p-duplication syndrome.** *Am J Med Genet A* 2009, **149A**(2):272–276.
16. Abu-Amero KK, Hellani AM, Salih MA, Seidahmed MZ, Elmalik TS, Zidan G, Bosley TM: **A de novo marker chromosome derived from 9p in a patient with 9p partial duplication syndrome and autism features: genotype-phenotype correlation.** *BMC Med Genetics* 2010, **11**:135.
17. Bonaglia MC, Giorda R, Carrozzo R, Roncoroni ME, Grasso R, Borgatti R, Zuffardi O: **20-Mb duplication of chromosome 9p in a girl with minimal physical findings and normal IQ: narrowing of the 9p duplication critical region to 6 Mb.** *Am J Med Genet* 2002, **112**(2):154–159.
18. Chen CP, Lin SP, Su YN, Chern SR, Tsai FJ, Chen WL, Wang W: **Self-injurious behavior associated with trisomy 9p (9p13.1-p24.3).** *Genet Couns* 2011, **22**(3):327–331.
19. Muroya K, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, Kameyama J, Sato H, Suzuki Y, Terasaki H, Gomyo H, et al: **Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases.** *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**(9):3094–3100.
20. Shan Z, Zabel B, Trautmann U, Hillig U, Ottolenghi C, Wan Y, Haaf T: **FISH mapping of the sex-reversal region on human chromosome 9p in two XY females and in primates.** *Eur J Hum Genet* 2000, **8**(3):167–173.
21. Livadas S, Mavrou A, Sofocleous C, van Vliet-Constantinidou C, Dracopoulou M, Dacou-Voutetakis C: **Gonadoblastoma in a patient with del(9)(p22) and sex reversal: report of a case and review of the literature.** *Cancer Genet Cytogenet* 2003, **143**(2):174–177.
22. Hauge X, Raca G, Cooper S, May K, Spiro R, Adam M, Martin CL: **Detailed characterization of, and clinical correlations in, 10 patients with distal deletions of chromosome 9p.** *Genet Med* 2008, **10**(8):599–611.
23. Bouhjar IB, Hannachi H, Zerelli SM, Labalme A, Gmidene A, Soyah N, Missaoui S, Sanlaville D, Elghezal H, Saad A: **Array-CGH study of partial trisomy 9p without mental retardation.** *Am J Med Genet A* 2011, **155A**(7):1735–1739.
24. Willatt LR, Barber JC, Clarkson A, Simonic I, Raymond FL, Docherty Z, Ogilvie CM: **Novel deletion variants of 9q13-q21.12 and classical euchromatic variants of 9q12/qh involve deletion, duplication and triplication of large tracts of segmentally duplicated pericentromeric euchromatin.** *Eur J Hum Genet* 2007, **15**(1):45–52.
25. Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrtchyan H, Aroutiounian R, Polityko AD, Kulpanovich AI, Egorova T, et al: **Heteromorphic variants of chromosome 9.** *Mol Cytogenet* 2013, **6**(1):14.
26. Wajntal A, Gonzalez CH, Koiffmann CP, de Souza DH: **Brief cytogenetic report on maternal translocation t(7;9) (p22;p13): two sibs with duplication 9p and one sib with the balanced translocation.** *Am J Med Genet* 1985, **20**(2):265–269.
27. Di Giacomo MC, Cesarano C, Bukvic N, Manisali E, Guanti G, Susca F: **Duplication of 9 p 11.2–p13.1: a benign cytogenetic variant.** *Prenat Diagn* 2004, **24**(8):619–622.
28. Humphray SJ, Oliver K, Hunt AR, Plumb RW, Loveland JE, Howe KL, Andrews TD, Searle S, Hunt SE, Scott CE, et al: **DNA sequence and analysis of human chromosome 9.** *Nature* 2004, **429**(6990):369–374.
29. Sato H, Masuda F, Takayama Y, Takahashi K, Saitoh S: **Epigenetic inactivation and subsequent heterochromatinization of a centromere stabilize dicentric chromosomes.** *Curr Biol* 2012, **22**(8):658–667.
30. Morrisette JJ, Laufer-Cahana A, Medne L, Russell KL, Venditti CP, Kline R, Zackai EH, Spinner NB: **Patient with trisomy 9p and a hypoplastic left heart with a tricentric chromosome 9.** *Am J Med Genet A* 2003, **123A**(3):279–284.
31. Sanlaville D, Baumann C, Lapierre JM, Romana S, Collet N, Cacheux V, Turleau C, Tachdjian G: **De novo inverted duplication 9p21pter involving telomeric repeated sequences.** *Am J Med Genet* 1999, **83**(2):125–131.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2 Publicações realizadas durante o período da tese como primeiro autor

Apêndice 4 - Meloni VFA, Piazzon FB, Soares MF, Takeno SS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Brunoni D, Melaragno MI. Cytogenomic characterization of an unexpected 17.6 Mb 9p deletion associated to a 14.8 Mb 20p duplication in a dysmorphic patient with multiple congenital anomalies presenting a normal G-banding karyotype. *Gene* 496:59-62 (2012). 1ª Página.

Apêndice 5 - Meloni VA, Takeno SS, Pilla AL, de Mello CB, Melaragno MI, Kulikowski LD. Trisomy 1q32 and monosomy 11q25 associated with congenital heart defect: cytogenomic delineation and patient fourteen years follow-up. *Mol Cytogenet* 7:57-60 (2014). 1ª Página.

Apêndice 6 - Meloni VA, Guilherme RS, Oliveira MM, Migliavacca M, Takeno SS, Sobreira NL, de Fatima Faria Soares M, de Mello CB, Melaragno MI. Cytogenomic delineation and clinical follow-up of two siblings with an 8.5 Mb 6q24.2-q25.2 deletion inherited from a paternal insertion. *Am J Med Genet A* 164:2378-2384 (2014). 1ª Página.

Apêndice 7 - Meloni VA, Moyses-Oliveira M, Melo MCC, Caneloi TP, Dantas AG, Soares MFF, Fock R, de Nicola PDR, Dias-da-Silva MR, Melaragno MI. Novel homozygous *ALX4* mutation causing Frontonasal Dysplasia-2 in a patient with meningoencephalocele. *Clin Genet* 88: 593-596 (2015). 1ª Página.

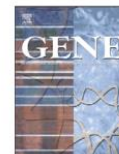
Apêndice 4 Meloni et al., 2012.

Gene 496 (2012) 59–62



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Short Communication

Cytogenomic characterization of an unexpected 17.6 Mb 9p deletion associated to a 14.8 Mb 20p duplication in a dysmorphic patient with multiple congenital anomalies presenting a normal G-banding karyotype

Vera de Freitas Ayres Meloni ^a, Flavia Balbo Piazzon ^d, Maria de Fátima de Faria Soares ^b,
Sylvia Satomi Takeno ^a, Denise Maria Christofolini ^c, Leslie Domenici Kulikowski ^d,
Decio Brunoni ^a, Maria Isabel Melaragno ^{a,*}

^a Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Imaging Diagnosis, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Gynecology and Obstetrics Division, ABC School of Medicine, Santo André, SP, Brazil

^d Department of Pathology, Cytogenomics Laboratory, LIM 03, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 January 2012

Available online 20 January 2012

Keywords:

Duplication 20p

Deletion 9p

Array

FISH

MLPA

ABSTRACT

We describe a female patient with developmental delay, dysmorphic features and multiple congenital anomalies who presented a normal G-banded karyotype at the 550-band resolution. Array and multiplex-ligation probe amplification (MLPA) techniques identified an unexpected large unbalanced genomic aberration: a 17.6 Mb deletion of 9p associated to a 14.8 Mb duplication of 20p. The deleted 9p genes, especially *CER1* and *FREM1*, seem to be more relevant to the phenotype than the duplicated 20p genes. This study also shows the relevance of using molecular techniques to make an accurate diagnosis in patients with dysmorphic features and multiple anomalies suggestive of chromosome aberration, even if on G-banding their karyotype appears to be normal. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was necessary to identify a masked balanced translocation in the patient's mother, indicating the importance of associating cytogenetic and molecular techniques in clinical genetics, given the implications for patient management and genetic counseling.

© 2012 Elsevier B.V. Open access under the [Elsevier OA license](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

1. Introduction

Etiology identification of intellectual disability and physical dysmorphism represents a constant challenge for clinical geneticists. Since conventional karyotyping often fails to detect submicroscopic chromosomal rearrangements, molecular genetics methods have become a very useful tool that has greatly increased the ability to identify pathogenic genomic imbalances. Array techniques have improved the diagnostic success in patients with intellectual deficiency, dysmorphic features and multiple congenital anomalies, disclosing new microdeletion and microduplication syndromes (Mencarelli et al., 2008). Miller et al. (2010) suggested that the chromosomal microarray technique should be used as the first-tier genetic diagnostic test, instead of G-banded karyotyping, for individuals with unexplained developmental/intellectual disabilities, disorders of the autism spectrum, and congenital

malformation anomalies. Here, we report on a patient with developmental delay, dysmorphic features and multiple congenital anomalies, in which G-band chromosome analysis showed a normal 46, XX karyotype. Considering the patient's abnormal phenotype, suggestive of chromosome imbalance, the study was refined by using array and MLPA techniques, and a large 9p deletion associated to a 20p duplication were disclosed. FISH analysis only was able to detect the presence of a masked balanced translocation t(9;20)(p22.2;p12.1) in the patient's mother.

2. Clinical report

The proband, a female, was born at 41 weeks of gestation as the first child of a 20-year-old mother and a 26-year-old non-consanguineous father. Birth weight was 2865 g (3rd–5th centile), birth length and OFC were not reported. The first genetic evaluation was made at the age of six months, and the findings were: weight = 4370 g (<3rd centile); length = 62 cm (10th centile); OFC = 37 cm (<3rd centile); microcephaly, trigonocephaly, prominent metopic suture, bitemporal narrowness, arched and sparse eyebrows, ocular hypertelorism, upslanted palpebral fissures, prominent eyes, short nose, long philtrum, microstomia, three superior oral frenula, V-shaped cleft palate, small

Abbreviations: MLPA, multiplex-ligation probe amplification; FISH, Fluorescence in situ hybridization; OFC, Occipital–frontal circumference; MRI, Magnetic resonance imaging; DECIPHER, Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.

* Corresponding author at: Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 5576 4260.

E-mail address: melaragno.morfe@epm.br (M.I. Melaragno).

0378-1119 © 2012 Elsevier B.V. Open access under the [Elsevier OA license](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).
doi:10.1016/j.gene.2012.01.007

Apêndice 5 Meloni et al, 2014.

Meloni et al. *Molecular Cytogenetics* 2014, **7**:57
<http://www.molecularcytogenetics.org/content/7/1/57>



CASE REPORT

Open Access

Trisomy 1q32 and monosomy 11q25 associated with congenital heart defect: cytogenomic delineation and patient fourteen years follow-up

Vera Ayres Meloni¹, Sylvia Satomi Takeno¹, Ana Luiza Pilla¹, Claudia Berlim de Mello², Maria Isabel Melaragno¹ and Leslie Domenici Kulikowski^{3,4*}

Abstract

Background: Partial duplication 1q is a rare cytogenetic anomaly frequently associated to deletion of another chromosome, making it difficult to define the precise contribution of the different specific chromosomal segments to the clinical phenotype.

Case presentation: We report a clinical and cytogenomic study of a patient with multiple congenital anomalies, heart defect, neuromotor development delay, intellectual disability, who presents partial trisomy 1q32 and partial monosomy 11q25 inherited from a paternal balanced translocation identified by chromosome microarray and fluorescence *in situ* hybridization.

Conclusion: Compared to patients from the literature, the patient's phenotype is more compatible to the 1q32 duplication's clinical phenotype, although some clinical features may also be associated to the deleted segment on chromosome 11. This is the smallest 11q terminal deletion ever reported and the first association between 1q32.3 duplication and 11q25 deletion in the literature.

Keywords: Partial duplication 1q, Partial deletion 11q, Congenital heart defects, Array, FISH, Intellectual disability, Clinical follow-up

Background

Partial duplication 1q is a rare cytogenetic anomaly frequently associated to deletion of another chromosome, making it difficult to define the precise contribution of the different specific chromosomal segments to the clinical phenotype. The duplicated material can result either from an inherited rearrangement or due to an unbalanced *de novo* translocation, duplication, or insertion [1]. The terminal duplication 1q is associated to pre and postnatal growth retardation, dysmorphisms, multiple congenital malformations, including heart defects, and intellectual disability [2]. Only 12 patients have been described in literature with duplication of the distal long arm of

chromosome 1 without other concomitant chromosomal imbalance [3-14]. Most cases of these 1q duplication involve the 1q32qter region; and translocations involve multiple chromosomes, including 3p, 5p, 7p, 21q, and Xq [15].

The 11q terminal deletion was first described by Jacobsen et al. [16] and has a recognized pattern of malformation. Jacobsen syndrome (JBS, OMIM 147791) is a contiguous gene disorder caused by 7 to 20 Mb 11qter deletions. More than 100 cases have been described in literature and the clinical findings include developmental delay, short stature, congenital heart defects (CHD), thrombocytopenia, genitourinary anomalies, pyloric stenosis, and ophthalmologic anomalies.

Here we report on a patient with a duplication of 37 Mb of the distal long arm of chromosome 1 from 1q32 to 1qter associated to a 2 Mb 11q25qter deletion inherited from his father's balanced translocation. SNP-array and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques were used to define the specific breakpoints.

* Correspondence: lesliekulik@usp.br

³Department of Pathology, Cytogenomics Lab, LIM 03, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, bloco 12, sala 7, São Paulo, SP, Brazil

⁴Human Reproduction and Genetics Center, Department of Collective Health, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Meloni et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice 6 Meloni et al., 2014.

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART ACytogenomic Delineation and Clinical Follow-up
of Two Siblings with an 8.5 Mb 6q24.2-q25.2
Deletion Inherited From a Paternal Insertion[†]Vera Ayres Meloni,^{1*} Roberta Santos Guilherme,¹ Mariana Moyses Oliveira,¹ Michele Migliavacca,¹
Sylvia Satomi Takeno,¹ Nara Lygia Macena Sobreira,² Maria de Fatima Faria Soares,⁴
Claudia Berlim de Mello,³ and Maria Isabel Melaragno¹¹Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil²McKusick Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland³Department of Imaging Diagnosis, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil⁴Psychobiology Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Manuscript Received: 9 December 2013; Manuscript Accepted: 30 April 2014

The chromosomal segment 6q24-q25 comprises a contiguous gene microdeletion syndrome characterized by intrauterine growth retardation, growth delay, intellectual disability, cardiac anomalies, and a dysmorphic facial phenotype. We describe here a 10-year follow-up with detailed clinical, neuropsychological, and cytomic data of two siblings, male and female, who presented with developmental delay, microcephaly, short stature, characteristic facial dysmorphisms, multiple organ anomalies, and intellectual disability. Microarray analysis showed an 8.5 Mb 6q24.2-q25.2 interstitial deletion. Fluorescence in situ hybridization analyses confirmed the deletions and identified an insertion of 6q into 8q13 in their father, resulting in a high recurrence risk. This is the first report in sibs with distinct neuropsychological involvement, one of them with stenosis of the descending branch of the aorta. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: interstitial deletion; chromosome 6; array; cytogenomics; congenital heart disease; aortic coarctation; clinical follow-up

INTRODUCTION

Reports of interstitial deletions of the long arm of chromosome 6 are rare. There are 10 reports in literature describing 15 patients with 6q24-q25 interstitial deletions [McLeod et al., 1990; Narahara et al., 1991; Pirola et al., 1998; Sukumar et al., 1999; Bisgaard et al., 2006; Tanteles et al., 2007; Caselli et al., 2007; Nowaczyk et al., 2008; Nagamani et al., 2009; Thienpont et al., 2010]. Sukumar et al. [1999] published the first report of chromosome 6q24.2q25.1 interstitial deletion, which included three patients with deletions of different sizes, studied by karyotyping and FISH. Nowaczyk et al. [2008] reported three patients with an apparently de novo paternal 6q24.3 deletion and proposed a contiguous gene syndrome with dysmorphic features and growth failure (OMIM #612863). To date, the patients described present a large spectrum of clinical features, depending on the size of the deleted

How to Cite this Article:

Meloni VA, Guilherme RS, Oliveira MM, Migliavacca M, Takeno SS, Sobreira NLM, Soares MFF, Mello CB, Melaragno MI. 2014. Cytogenomic delineation and clinical follow-up of two siblings with an 8.5 Mb 6q24.2-q25.2 deletion inherited from a paternal insertion. *Am J Med Genet Part A* 164A:2378–2384.

segment, making the genotype–phenotype correlation difficult, in part because there are few papers with precise molecular breakpoint determinations.

Most patients present intrauterine growth retardation (IUGR), growth delay (GD), intellectual disability (ID), cardiac defects, and a dysmorphic facial phenotype [Kumar et al., 1997; Caselli et al., 2007; Nowaczyk et al., 2008]. We report on the 10-year clinical follow-up, neuropsychological, and cytomic data of two siblings with an 8.5 Mb interstitial deletion of segment 6q24.2-

Conflict of interest: none.

[†]This article was published online on 4 June 2014. Errors were subsequently identified in Fig. 2. The corrected figure is shown here. Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP); Grant sponsor: National Human Genome Research Institute; Grant number: NHGRI-1U54HG006542.

*Correspondence to:

Vera Ayres Meloni, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil.

E-mail: vera.meloni@gmail.com

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 4 June 2014

DOI 10.1002/ajmg.a.36631

Apêndice 7 Meloni et al., 2015.

CLINICAL GENETICS An International Journal of Genetics, Molecular and Personalized Medicine

Clin Genet 2015; 88: 593–596
Printed in Singapore. All rights reserved

© 2015 John Wiley & Sons A/S.
Published by John Wiley & Sons Ltd
CLINICAL GENETICS
doi: 10.1111/cge.12595

Letter to the Editor

Novel homozygous *ALX4* mutation causing frontonasal dysplasia-2 in a patient with meningoencephalocele

To the Editor:

Mutations in *ALX4* gene have been associated with skull ossification defects including symmetrical parietal

foramina (1). While *ALX4* heterozygous loss-of-function has been associated with symmetrical parietal ossification defects with vertical transmission (2, 3),

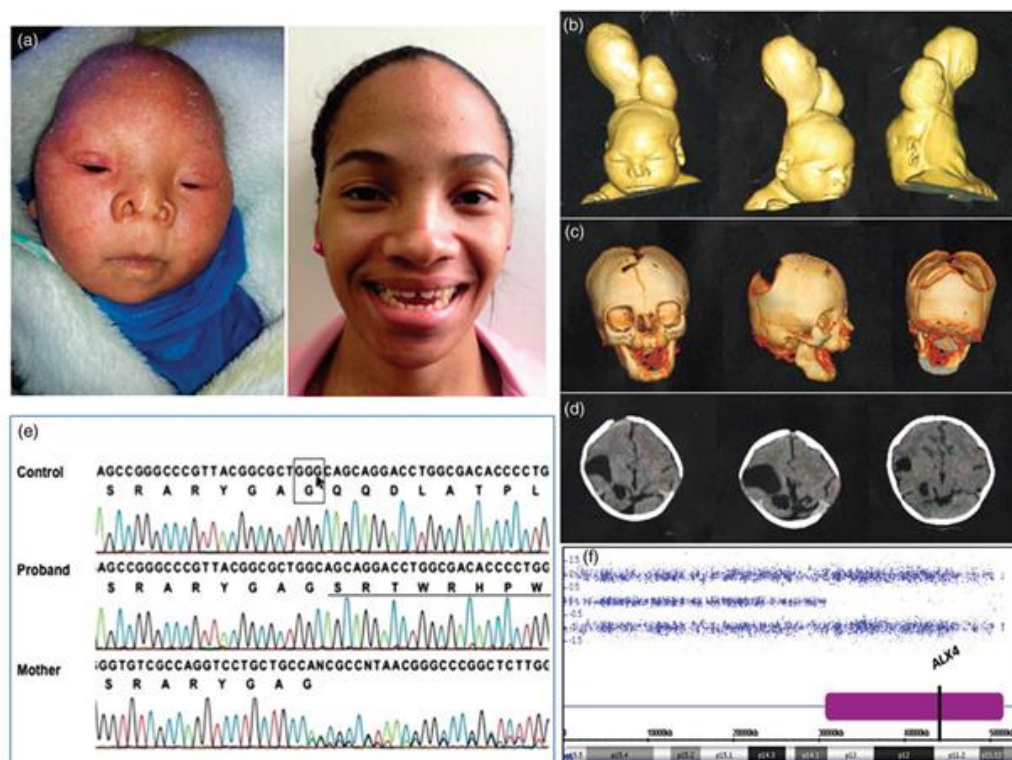


Fig. 1. Frontal facial appearance of the proband at 5 months of age (a). 3-D computerized tomographic (CT) scan of proband at 1 day old showing microcranium, brachycephaly, hypertelorism and meningoencephalocele in the high convexity of the skull extruding from the enlarged parietal foramen (b). 3-D CT scan of proband at 13 months showing bone defects abnormalities on cranial bone plate (c). Brain CT scan of the proband at 13 months showing corpus callosum agenesis, widened interhemispheric fissure and an occipital paramedian line cyst, lateral ventricles poorly characterized and probable cortical dysplasia (d). Partial sequencing electropherogram of the *ALX4* gene's exon 1 using specific intronic primers (list available on request). Control shows the *ALX4* normal DNA reference (NG_015809.1) and its respective amino acids below codons; proband shows *ALX4* p.Gly69fsX112 (c.205delG) homozygous mutation with the representation of the first eight altered amino acids (underlined) before the stop codon created downstream (X112) caused by a G-deletion frameshift in both alleles; mother showing heterozygous deletion (displayed as reverse sequencing) (e). Genomic array data for chromosome 11p showing a 20.8 Mb region of homozygosity (purple bar) at chr11:30,776,678–51,563,636 (GRCh37/hg19), which encompassed *ALX4* gene (f). Frontal facial appearance of the patient's mother (g).

3 Outras Publicações realizadas durante o período da tese

Apêndice 8- Sodré CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, Belangero SI, Christofolini DM, Kulikowski LD, Melaragno MI. Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res* 26:134-43 (2010). 1ª Página.

Apêndice 9-Guilherme RS, Meloni VF, Sodré CP, Christofolini DM, Pellegrino R, de Mello CB, Conlin LK, Hutchinson AL, Spinner NB, Brunoni D, Kulikowski LD, Melaragno MI. Cytogenetic and molecular evaluation and 20-year follow-up of a patient with ring chromosome 14. *Am J Med Genet A* 152:2865-2869 (2010). 1ª Página.

Apêndice 10- Christofolini DM, Meloni VA, de Paula Ramos MA, Oliveira MM, de Mello CB, Pellegrino R, Takeno SS, Melaragno MI. Autistic disorder phenotype associated to a complex 15q intrachromosomal rearrangement. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159:823-828 (2012). 1ª Página.

Apêndice 11- Guilherme RS, Meloni VFA, Takeno SS, Pellegrino R, Brunoni D, Kulikowski LD, Melaragno MI. Twenty-year cytogenetic and molecular follow-up of a patient with ring chromosome 15: a case report. *J Med Case Rep* 6:283-286 (2012). 1ª Página.

Apêndice 12- Guilherme RS, Kim CA, Alonso LG, Meloni VFA, Honjo RS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Melaragno MI. Ring chromosome 10: report on two patients and review of the literature. *J Applied Gen* 54:35-41 (2013). 1ª Página.

Apêndice 13- Oliveira MM, Meloni VA, Canonaco RS, Takeno SS, Bortolai A, de Mello CB, de Lima FT, Melaragno MI. Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome in an adolescent with complex chromosomal rearrangement and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 164:2685-2688 (2014). 1ª Página.

Apêndice 14- Carvalheira G, Oliveira MM, Takeno S, de Lima FT, Meloni VA, Melaragno MI. 19q13.33→qter trisomy in a girl with intellectual impairment and seizures. *Meta Gene* 2:799–806 (2014). 1ª Página.

Apêndice 15- Moysés-Oliveira M, Guilherme RS, Dantas AG, Ueta R, Perez ABA, Haidar M, Canonaco R, Meloni VA, Kosyakova N, Lieher T, Carnevalheira G, Melaragno MI. Genetic mechanisms leading to primary amenorrhea in balanced X-autosome translocations. *Fertility and Sterility* 103:1289-1296 (2015). 1ª Página.

Apêndice 16- Moysés-Oliveira M, Guilherme RS, Meloni VA, Di Battista A, de Mello CB, Bragagnolo S, Moretti-Ferreira D, Kosyakova N, Liehr T, Carnevalheira GM, Melaragno MI. X-linked intellectual disability related genes disrupted by balanced X-autosome translocations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 168:669-677 (2015). 1ª Página.

Apêndice 17- Guilherme RS, Hermetz KE, Varela PT, Perez AB, Meloni VA, Rudd MK, Kulikowski LD, Melaragno MI. Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres. *Mol Cytogenet* 8:32-38 (2015). 1ª Página.

Apêndice 8 Sodré et al., 2010.



Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings

C.P. Sodré¹, R.S. Guilherme¹, V.F.A. Meloni¹, D. Brunoni¹,
Y. Juliano³, J.A.D. Andrade¹, S.I.N. Belangero¹, D.M. Christofolini¹,
L.D. Kulikowski^{1,2} and M.I. Melaragno¹

¹Departamento de Morfologia e Genética da
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Departamento de Patologia, LIM 03,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

³Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding author: M.I. Melaragno
E-mail: melaragno.morf@epm.br

Genet. Mol. Res. 9 (1): 134-143 (2010)

Received October 5, 2009

Accepted October 29, 2009

Published January 26, 2010

ABSTRACT. Ring chromosomes are often associated with abnormal phenotypes due to loss of genomic material and also because of ring instability at mitosis after sister chromatid exchange events. We investigated ring chromosome instability in six patients with ring chromosomes 4, 14, 15, and 18 by examining 48- and 72-h lymphocyte cultures at the first, second and subsequent cell divisions after bromodeoxyuridine incorporation. Although most cells from all patients showed only one monocentric ring chromosome, ring chromosome loss and secondary aberrations were observed both in 48- and 72-h lymphocyte cultures and in

Apêndice 9 Guilherme et al., 2010

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART A

Cytogenetic and Molecular Evaluation and 20-Year Follow-Up of a Patient With Ring Chromosome 14

Roberta Santos Guilherme,¹ Vera de Freitas Ayres Meloni,¹ Claudete Palmer Sodré,¹ Denise Maria Christofolini,¹ Renata Pellegrino,² Claudia Berlim de Mello,² Laura Kathleen Conlin,^{3,4} Anne Lawlor Hutchinson,^{3,4} Nancy Bettina Spinner,^{3,4} Decio Brunoni,¹ Leslie Domenici Kulikowski,^{1,5} and Maria Isabel Melaragno^{1*}

¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Division of Human Genetics and Molecular Biology, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania

⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania

⁵Department of Pathology, School of Medicine, LIM 03, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

Received 5 May 2010; Accepted 9 August 2010

We present a 20-year follow-up on a patient with a ring chromosome 14. The ring chromosome was studied by fluorescence in situ hybridization (FISH), multiplex-ligation probe amplification (MLPA), and genome wide SNP array, and no deletions of chromosome 14 were detected, although the telomeric repeat sequence was absent from the ring chromosome. The patient had skeletal abnormalities, and susceptibility to infections, as well as seizures and retinal pigmentation, which are commonly found in individuals with a ring 14. Our patient corroborates the idea that even when no genes are lost during ring formation, a complete ring chromosome can produce phenotypic alterations, which presumably result from ring instability or gene silencing due to the new chromosomal architecture. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: instability; follow-up; ring chromosome and SNP-array

INTRODUCTION

Ring chromosome are an uncommon cytogenetic finding both pre and post-natally, but they have been reported for all human chromosomes [Schinzel, 2001]. Ring chromosomes are generally considered to result from distal breakage of the short and long arm of a chromosome with fusion of the ends. There are also reports with no apparent deletion of the telomeric ends, thus resulting in complete ring chromosomes [Sigurdardottir et al., 1999]. Patients with complete ring chromosomes often exhibit a general overlap in phenotype, the so-called "ring syndrome" [Kosztolanyi, 1987], with growth failure and no or minor anomalies. The abnormal phenotype is usually attributed to cell death during development. Knijnenburg et al. [2007] proposed that sister chromatid exchange during the cell cycle may cause mechanical interference with cell division due to disruption, breakage, entangling, or doubling of rings, resulting in aneuploidy and possible death of the daughter cells.

How to Cite this Article:

Guilherme RS, de Freitas Ayres Meloni V, Sodré CP, Christofolini DM, Pellegrino R, de Mello CB, Conlin LK, Hutchinson AL, Spinner NB, Brunoni D, Kulikowski LD, Melaragno MI. 2010. Cytogenetic and molecular evaluation and 20-year follow-up of a patient with ring chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 152A:2865–2869.

Ring chromosome 14 is a rare cytogenetic disorder, first described by Gilgenkrantz et al. [1984]. To date, there are over 50 cases reported in the literature that demonstrate a characteristic phenotype. The phenotypic features of patients with a ring 14 were recently reviewed by Zollino et al. [2009]. These authors found that ring chromosome 14 patients with breakpoints at q32 present with developmental delay, seizures, and characteristic facial features. Another group of patients do not have 14q deletions associated with ring formation (complete ring), and these patients do not have the characteristic facial features, suggesting that the genes for these features map to the terminal portion of chromosome 14. Other common features include dolichocephaly, epicanthal folds, downslanting palpebral fissures, large and low-set ears, short neck,

Grant sponsor: FAPESP, Brazil; Grant Number: #07/58735-5; Grant sponsor: Ring chromosome 20 Foundation.

*Correspondence to:

Maria Isabel Melaragno, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: melaragno.morf@epm.br

Published online 12 October 2010 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.33689

Apêndice 10 Christofolini et al., 2012

RESEARCH ARTICLE

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics
 Neuropsychiatric Genetics

PART
B

Autistic Disorder Phenotype Associated to a Complex 15q Intrachromosomal Rearrangement

Denise Maria Christofolini,^{1*} Vera Ayres Meloni,² Marco Antonio de Paula Ramos,² Mariana Moysés Oliveira,² Claudia Berlim de Mello,³ Renata Pellegrino,³ Sylvia Satomi Takeno,² and Maria Isabel Melaragno²

¹Genetics Division, Department of Gynecology and Obstetrics, Faculdade de Medicina do ABC [1] (FMABC), São Paulo, Brazil

²Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo [2 and 3] (UNIFESP), São Paulo, Brazil

³Psychobiology Department, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

Manuscript Received: 13 March 2012; Manuscript Accepted: 11 July 2012

The proximal regions of acrocentric chromosomes, particularly 15q11.2, are frequently involved in structural rearrangement. However, interstitial duplications involving one of the chromosome 15 homologues are less frequent, with few patients described with molecular techniques. These patients present distinctive clinical findings including developmental delay and intellectual disability, minor dysmorphic facial features, epilepsy, and autistic behavior. Here we describe an interstitial rearrangement of chromosome 15 composed of a triplication ~6.9 Mb from 15q11.2 to 15q13.2 followed by a duplication of ~2.4 Mb from 15q13.2 to 15q13.3, defined using different approaches as MLPA, qPCR, array and FISH. FISH revealed that the middle part of the triplicated segment was in inverted position. The parental origin of the rearrangement was assessed using methylation assay and SNP array that revealed the maternal origin of the additional material. The patient presents most of the clinical features associated to 15q11.2 triplication: minor dysmorphic facial features, generalized epilepsy, absence seizures, intellectual disability, and autistic behavior. In conclusion, the use of more accurate molecular tools enabled a detailed investigation, providing the identification of intrachromosome duplication/triplication and bringing new light to the study of genetic causes of autistic disorders. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: chromosome rearrangement; interstitial triplication; microduplication; 15 chromosome; chromosome catastrophes

INTRODUCTION

Proximal regions of acrocentric chromosomes, particularly 15q11.2, are frequently involved in structural rearrangements. The heterogeneous nature of breakpoints involved in 15q abnormalities occurs due the presence of segmental duplications in this region conferring DNA instability by facilitating misalignment and illegitimate recombination during replication [Wandstrat and Schwartz, 2000].

How to Cite this Article:

Christofolini DM, Meloni VA, Ramos MAP, Oliveira MM, de Mello CB, Pellegrino R, Takeno SS, Melaragno MI. 2012. Autistic Disorder Phenotype Associated to a Complex 15q Intrachromosomal Rearrangement. *Am J Med Genet Part B*.

In fact chromosome 15 is one of the seven human chromosomes with a high rate of segmental duplication (regions >1 kb that are not high copy repeats and have >90% identity to another genomic region). These duplications are clustered in two regions located on proximal and distal 15q. Proximal 15q is notable since recombination among the segmental duplication can result in deletions causing Prader–Willi (PWS) and Angelman syndromes (AS) [Bailey et al., 2002; Zody et al., 2006].

Five recurrent breakpoints (BP) have been described in most patients of 15 rearrangements, from BP1 to BP5. PWS/AS critical region involves a segment that lies between BP2 and BP3 [Wang et al., 2008]. Each of the common breakpoints harbors transcribed END repeats that are derived from the ancestral *HERC2* locus, which is located just proximal to BP3, as well as a number of other low-copy repeat (LCR) elements. These repeat sequences are thought to mediate misalignment of the region during meiosis, leading to unequal recombination events and consequently deletions, duplications, triplications, or the generation of supernumerary marker chromosomes [Wang et al., 2004]. Parental origin of rearrangement has a large influence on phenotype, due to the presence of imprinted genes on this region.

*Correspondence to:

Denise Maria Christofolini, Av. Príncipe de Gales 821, CEP: 09060-650, Santo André, SP, Brazil. E-mail: denise.morfi@gmail.com
 Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2012
 DOI 10.1002/ajmg.b.32089

Apêndice 11 Guilherme et al., 2012

Guilherme et al. *Journal of Medical Case Reports* 2012, **6**:283
http://www.jmedicalcasereports.com/content/6/1/283



CASE REPORT

Open Access

Twenty-year cytogenetic and molecular follow-up of a patient with ring chromosome 15: a case report

Roberta S Guilherme¹, Vera de FA Meloni¹, Sylvia S Takeno¹, Renata Pellegrino², Decio Brunoni¹, Leslie D Kulikowski^{1,3} and Maria I Melaragno^{1*}

Abstract

Introduction: Ring chromosome 15 is a rare disorder, with only a few over 40 cases reported in the literature. There are only two previous reports of cases where patients with ring chromosome 15 have been followed-up.

Case presentation: We report here on the 20-year clinical and cytogenetic follow-up of a patient with a ring chromosome 15. Our patient, a Caucasoid Asian woman, presented with short stature, microcephaly, minor dysmorphic features, hyperextensible knees, generalized hirsutism, café-au-lait and small hypochromic spots spread over her face and the front of her chest and abdomen, dorsolumbar scoliosis and mild intellectual disability. She was followed-up from the age of eight to 28 years. When she was 27 years old, she was reported by her mother to present with compulsive overeating and an aggressive mood when challenged. Karyotyping revealed that the majority of her cells harbored one normal chromosome and one ring chromosome. Silver staining revealed the presence of the nucleolar organizer region in the ring chromosome. Ring loss and/or secondary aberrations exhibited a slight increase over time, from 4.67% in 1989 to 7.67% in 2009, with the presence of two monocentric rings, cells with interlocked rings, a dicentric ring, and broken or open rings. A genome-wide array technique detected a 5.5Mb deletion in 15q26.2.

Conclusions: We observed that some phenotypic alterations in our patient can be associated with gene loss and haploinsufficiency. Other features may be related to different factors, including ring instability and epigenetic factors.

Introduction

Ring chromosome 15 [r(15)] is a rare disorder that was first described by Jacobsen in 1966. Since then, more than 40 patients with r(15) have been reported in the literature. The common features found in these patients are: severe pre- and postnatal growth delay, low birth weight, triangular face, hypertelorism, microcephaly, intellectual disability, clinodactyly and brachydactyly of the fifth finger, small hands and feet, and multiple hyperpigmented or depigmented spots. Severe phenotypes can also be observed, presenting with congenital heart defects and renal anomalies. Some patients present with hypotonia, hydrocephaly, micrognathia, retinal abnormalities, ear anomalies, club

feet, café-au-lait spots, behavioral disorders and speech delay. Male patients may present with cryptorchidism, azoospermia, hypogonadism or hypogenitalism and in most of the cases they are sterile. Female patients seem to present with normal sexual development and gonadal function, but uterine hypoplasia has been reported in some cases [1].

A precise genotype-phenotype correlation is difficult to establish in these patients, because of differences in breakpoints, level of mosaicism and ring instability that result in a variable amount of genetic material loss. There are few studies in the literature that report on the clinical follow-up and detailed molecular and cytogenetic evaluation of patients with ring chromosomes, which could help establish anticipatory guidelines for these patients [2]. Regarding patients with r(15), there are only two previous reports detailing long-term follow-up [3,4].

* Correspondence: melaragno.morf@epm.br

¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, São Paulo 04023-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 Guilherme et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Apêndice 12 Guilherme et al., 2013

J Appl Genetics (2013) 54:35–41
DOI 10.1007/s13353-012-0128-7

HUMAN GENETICS · ORIGINAL PAPER

Ring chromosome 10: report on two patients and review of the literature

Roberta Santos Guilherme · Chong Ae Kim ·
Luis Garcia Alonso · Rachel S. Honjo ·
Vera Ayres Meloni · Denise Maria Christofolini ·
Leslie Domenici Kulikowski · Maria Isabel Melaragno

Received: 13 September 2012 / Revised: 23 November 2012 / Accepted: 26 November 2012 / Published online: 18 December 2012
© Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan 2012

Abstract Ring chromosome 10—r(10)—is a rare disorder, with 14 cases reported in the literature, but only two with breakpoint determination by high-resolution techniques. We report here on two patients presenting a ring chromosome 10, studied by G-banding, fluorescent in situ hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and SNP-array techniques, in order to investigate ring instability and determine breakpoints. Patient 1 showed a r(10)(p15.3q26.2) with a 7.9 Mb deletion in 10q26.2–q26.2, while patient 2 showed a r(10)(p15.3q26.13) with a 1.0 Mb deletion in 10p15.3 and a 8.8 Mb deletion in 10q26.13–q26.3, both unstable. While patient 1 presented with clinical features usually found in patients with r(10) and terminal 10q deletion, patient 2 presented characteristics so far not described in other patients with r(10), such as Dandy-Walker variant, osteopenia, semi-flexed legs, and dermal pigmentation regions. Our data and the data from

literature show that there are no specific clinical findings to define a r(10) syndrome.

Keywords FISH · SNP-array · Ring chromosome · Ring instability

Introduction

In 2001, Schinzel listed 12 patients with r(10) been reported in the literature (Lansky et al. 1977; Fryns et al. 1978; Sparkes et al. 1978; Simoni et al. 1979; Tsukino et al. 1980; Michels et al. 1981; Serville et al. 1982; Nakai et al. 1983; Kondo et al. 1984; Kishi et al. 1985; Higashi et al. 1992; Calabrese et al. 1994). ECARUCA website (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>) presents three more patients (Zorn 1984; Shapiro et al. 1985). Later on, Concolino et al. (2003), Gunnarsson et al. (2009) and Christopoulou et al. (2012) described three more patients. Common clinical features in these patients include short stature, intellectual disability, microcephaly, facial dysmorphism, ophthalmologic and urinary tract abnormalities, more specifically hydronephrosis, vesicoureteral reflux and recurrent urinary tract infections. Some patients present with different types of heart defects, feeding difficulties and febrile convulsions (Nakai et al. 1983; Tsukino et al. 1980). In boys, there is frequently poor genital development, such as bilateral cryptorchidism, small penis and hypoplastic scrotum (Schinzel 2001). The patient described by Concolino et al. (2003) had behavioral problems (unipolar affective disorder), and that of Calabrese et al. (1994) had aganglionic megacolon. The patient reported by Sparkes et al. (1978) was initially diagnosed with Turner syndrome and developed later on adenocarcinoma of the thyroid. We report here on two patients with ring chromosomes 10, studied in detail by different methodologies.

R. S. Guilherme · L. G. Alonso · V. A. Meloni ·
M. I. Melaragno (✉)
Genetics Division, Department of Morphology and Genetics,
Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740,
CEP 04023-900, São Paulo, Brazil
e-mail: melaragno.morf@epm.br

C. A. Kim · R. S. Honjo
Genetics Unit, Instituto da Criança, Universidade de São Paulo,
Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 647,
CEP 05403-000, São Paulo, Brazil

D. M. Christofolini
Gynecology and Obstetrics Division, ABC School of Medicine,
Avenida Príncipe de Gales 821,
CEP 09060-650, São Paulo, Brazil

L. D. Kulikowski
Department of Pathology, Cytogenomics Lab, LIM 03,
Universidade de São Paulo,
Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 255,
CEP 05403-000, São Paulo, Brazil

Apêndice 13 Oliveira et al., 2014

RESEARCH LETTER

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART A

Juvenile Polyposis/Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Syndrome in an Adolescent With Complex Chromosomal Rearrangement and Intellectual Disability

Mariana Moysés Oliveira,^{1†} Vera Ayres Meloni,^{1*†} Rosane Seidler Canonaco,² Sylvia Satomi Takeno,¹ Adriana Bortolai,^{1,2} Claudia Berlim de Mello,³ Fernanda Teresa de Lima,^{1,4} and Maria Isabel Melaragno¹¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Brazil²Genetics Division, Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, Brazil³Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, Brazil⁴Department of Gynecology, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Manuscript Received: 14 March 2014; Manuscript Accepted: 27 June 2014

TO THE EDITOR:

Juvenile polyposis syndrome (JPS, OMIM #174900) is a rare dominant inherited polyposis predisposition syndrome, with mutations and deletions in *SMAD4* and *BMPRIA* genes [Jass et al., 1988; Howe et al., 1998; Howe et al., 2001; Aretz et al., 2007]. Although, it is well established that the association of JPS with hereditary hemorrhagic telangiectasia (JPS-HHT, OMIM #175050) is caused by *SMAD4* gene mutations, a gene mapped to 18q21.2 [Howe et al., 2004; Gallione et al., 2004], JPS and JPS-HHT phenotypes have never been reported in patients with chromosome 18 rearrangements. Here, we describe the first patient with JPS-HHT, dysmorphisms and intellectual disability caused by a complex chromosomal rearrangement with *SMAD4* gene loss. The patient carries two de novo microdeletions identified by SNP-array, encompassing 3.5 Mb in the 18q21.1q21.2 region, associated to a t(6;18) translocation.

The male patient (Fig. 1a), the second child of a healthy young nonconsanguineous couple, was born at full-term by cesarean after a normal pregnancy with a weight of 3,740 g (50th–75th centile), length of 49 cm (25th–50th centile) and unknown occipital frontal circumference (OFC). He was first seen at the age of 2 years and 10 months, for investigation of attention disorder, mild neuro-motor development and speech delay. At that age, he had normal growth development, mild facial dysmorphisms (high forehead, synophrys, prominent nose, exotropia, down-slanted palpebral fissures and prominent chin) and recurrent epistaxis. At the age of 10, the neuropsychological evaluation showed moderated intellectual disability, limited verbal language repertoire and attention-deficit/hyperactivity disorder. The magnetic resonance imaging (MRI) revealed *corpus callosum* agenesis and an arteriovenous malformation. At the same age, intestinal polyposis was detected by colonoscopy evaluation after rectal bleeding episodes, with typical juvenile polyps' histology,

How to Cite this Article:

Oliveira MM, Meloni VA, Canonaco RS, Takeno SS, Bortolai A, de Mello CB, de Lima FT, Melaragno MI. 2014. Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome in an adolescent with complex chromosomal rearrangement and intellectual disability.

Am J Med Genet Part A. 164A:2685–2688.

fulfilling JPS syndrome clinical criteria. Annual colonoscopies were indicated, and at the age of 11, tubular adenomas were detected (Fig. 2).

The patient's karyotype is 46,XY,t(6;18)(q13;q21)dn, which indicates a de novo apparently balanced translocation (Fig. 1b). The Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 array performed in the patient, and his parents revealed two noncontinuous

This study was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP 0394/10). Conflict of interest: none.

*These authors contributed equally to this manuscript.

Grant sponsor: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo; Grant number: FAPESP 2010/05123-5.

*Correspondence to:

Vera Ayres Meloni, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP Brazil.

Email: vera.meloni@gmail.com

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 31 July 2014

DOI 10.1002/ajmg.a.36690

Apêndice 14 Carvalho et al., 2014

Meta Gene 2 (2014) 799–806



Contents lists available at ScienceDirect

Meta Gene



19q13.33→qter trisomy in a girl with intellectual impairment and seizures



Gianna Carvalheira^a, Mariana Moysés Oliveira^a, Sylvia Takeno^a,
Fernanda Teresa de Lima^b, Vera Ayres Meloni^a, Maria Isabel Melaragno^{a,*}

^a Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Department of Morphology and Genetics, São Paulo, Brazil

^b Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Department of Mastology, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Revised 1 September 2014

Accepted 8 September 2014

Available online xxxx

Keywords:

Translocation t(19q;21p)

de novo 19q13.33 trisomy

Gene regulation

Intellectual impairment

Seizures

ABSTRACT

Rearrangements in chromosome 19 are rare. Among the 35 patients with partial 19q trisomy described, only six have a breakpoint defined by array. The 19q duplication results in a variable phenotype, including dysmorphisms, intellectual disability and seizure. In a female patient, although G-banding at 550 band-resolution was normal, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique and genomic array showed a 10.6 Mb terminal duplication of chromosome 19q13. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) revealed that the duplicated region was attached to the short arm of chromosome 21 and silver staining showed four small acrocentrics with nucleolar organization region (NOR) activity, suggesting that the breakpoint in chromosome 21 was at p13. This is the first *de novo* translocation between 19q13.33 and 21p13 described in liveborn. The chromosome 19 is known to be rich in coding and non-coding regions, and chromosomal rearrangements involving this chromosome are very harmful. Furthermore, the 19q13.33→qter region is dense in pseudogenes and microRNAs, which are potent regulators of gene expression. The trisomic level of this region may contribute to deregulation of global gene expression, and consequently, may lead to abnormal development on the carriers of these rearrangements.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Introduction

Developmental delay and intellectual disability affect around 3% of the general population (Shevell et al., 2003). In many cases, although patients present normal karyotypes, they can be carriers of cryptic genomic

* Corresponding author.

E-mail address: melaragno.maria@unifesp.br (M.I. Melaragno).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2014.09.004>

2214-5400/© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Genetic mechanisms leading to primary amenorrhea in balanced X-autosome translocations

Mariana Moysés-Oliveira, M.Sc.,^a Roberta dos Santos Guilherme, M.Sc.,^{a,b} Anelisa Gollo Dantas, B.S.,^a Renata Ueta, B.S.,^a Ana Beatriz Perez, Ph.D.,^a Mauro Haidar, Ph.D.,^c Rosane Canonaco, M.D.,^d Vera Ayres Meloni, M.D.,^a Nadezda Kosyakova, Ph.D.,^b Thomas Liehr, Ph.D.,^b Gianna Maria Carnevali, Ph.D.,^a and Maria Isabel Melaragno, Ph.D.^a

^a Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, and ^c Department of Gynecology, Universidade Federal de São Paulo; ^d Genetics Division, Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil; and ^b Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

Objective: To map the X-chromosome and autosome breakpoints in women with balanced X-autosome translocations and primary amenorrhea, searching candidate genomic loci for female infertility.

Design: Retrospective and case-control study.

Setting: University-based research laboratory.

Patient(s): Three women with balanced X-autosome translocation and primary amenorrhea.

Intervention(s): Conventional cytogenetic methods, genomic array, array painting, fluorescence in situ hybridization, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

Main Outcome Measure(s): Karyotype, copy number variation, breakpoint mapping, and gene expression levels.

Result(s): All patients presented with breakpoints in the Xq13q21 region. In two patients, the X-chromosome breakpoint disrupted coding sequences (*KIAA2022* and *ZDHHC15* genes). Although both gene disruptions caused absence of transcription in peripheral blood, there is no evidence that supports the involvement of these genes with ovarian function. The *ZDHHC15* gene belongs to a conserved syntenic region that encompasses the *FGF16* gene, which plays a role in female germ line development. The break in the *FGF16* syntenic block may have disrupted the interaction between the *FGF16* promoter and its *cis*-regulatory element. In the third patient, although both breakpoints are intergenic, a gene that plays a role in the DAX1 pathway (*FHL2* gene) flanks distally the autosome breakpoint. The *FHL2* gene may be subject to position effect due to the attachment of an autosome segment in Xq21 region.

Conclusion(s): The etiology of primary amenorrhea in balanced X-autosome translocation patients may underlie more complex mechanisms than interruption of specific X-linked candidate genes, such as position effect. The fine mapping of the rearrangement breakpoints may be a tool for identifying genetic pathogenic mechanisms for primary amenorrhea.

(Fertil Steril® 2015; ■: ■-■. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: X-chromosome, reciprocal translocation, female fertility, primary amenorrhea, position effect

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/moysesoliveira-primary-amenorrhea-x-autosome-translocations/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Premature ovarian insufficiency (POI, OMIM [Online Mendelian Inheritance in Man] 311360) is defined as the cessation of ovarian function associated with elevated gonadotropins serum levels (FSH ≥ 40

UI/L) before the age of 40 years (1). Premature ovarian insufficiency causing hypergonadotropic hypogonadism occurs in 1% of reproductive-age women, and the most severe cases exhibit gonadal dysgenesis and primary amenorrhea (2). The pathogenic mechanisms leading to POI are complex and heterogeneous, including chromosomal, genetic, autoimmune, metabolic, infectious, and iatrogenic factors (3, 4). Despite diagnostic advances, 50% of cases remain idiopathic (5). Genetic causes can be identified in approximately 20%–25% of cases,

Received November 25, 2014; revised January 15, 2015; accepted January 21, 2015.

M.M.-O. has nothing to disclose. R.d.S.G. has nothing to disclose. A.G.D. has nothing to disclose. R.U. has nothing to disclose. A.B.P. has nothing to disclose. M.H. has nothing to disclose. R.C. has nothing to disclose. V.A.M. has nothing to disclose. N.K. has nothing to disclose. T.L. has nothing to disclose. G.M.C. has nothing to disclose. M.I.M. has nothing to disclose.

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2011/51690-1).

Reprint requests: Maria Isabel Melaragno, Ph.D., Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil (E-mail: melaragno.morf@epm.br).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2015 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2015 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.030>

Apêndice 16 Moysés-Oliveira et al., 2015

RESEARCH ARTICLE

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART B
Neuropsychiatric Genetics

X-Linked Intellectual Disability Related Genes Disrupted by Balanced X-Autosome Translocations

Mariana Moysés-Oliveira,¹ Roberta Santos Guilherme,^{1,2} Vera Ayres Meloni,¹ Adriana Di Battista,¹ Claudia Berlim de Mello,³ Silvia Bragagnolo,¹ Danilo Moretti-Ferreira,⁴ Nadezda Kosyakova,² Thomas Liehr,² Gianna Maria Carnevali,¹ and Maria Isabel Melaragno^{1*}
¹Department of Morphology and Genetics, Genetics Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Jena, Germany

³Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Genetics, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brazil

Manuscript Received: 30 April 2015; Manuscript Accepted: 10 July 2015

Detailed molecular characterization of chromosomal rearrangements involving X-chromosome has been a key strategy in identifying X-linked intellectual disability-causing genes. We fine-mapped the breakpoints in four women with balanced X-autosome translocations and variable phenotypes, in order to investigate the corresponding genetic contribution to intellectual disability. We addressed the impact of the gene interruptions in transcription and discussed the consequences of their functional impairment in neurodevelopment. Three patients presented with cognitive impairment, reinforcing the association between the disrupted genes (*TSPAN7*—*MRX58*, *KIAA2022*—*MRX98*, and *ILIRAPL1*—*MRX21/34*) and intellectual disability. While gene expression analysis showed absence of *TSPAN7* and *KIAA2022* expression in the patients, the unexpected expression of *ILIRAPL1* suggested a fusion transcript *ZNF611-ILIRAPL1* under the control of the *ZNF611* promoter, gene disrupted at the autosomal breakpoint. The X-chromosomal breakpoint definition in the fourth patient, a woman with normal intellectual abilities, revealed disruption of the *ZDHHC15* gene (*MRX91*). The expression assays did not detect *ZDHHC15* gene expression in the patient, thus questioning its involvement in intellectual disability. Revealing the disruption of an X-linked intellectual disability-related gene in patients with balanced X-autosome translocation is a useful tool for a better characterization of critical genes in neurodevelopment.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: intellectual disability; X-chromosome; *KIAA2022*; *ILIRAPL1*; *TSPAN7*; *ZDHHC15*

INTRODUCTION

Intellectual disability (ID) consists of a broad range of disorders characterized by low general intellectual functioning (IQ below 70) and reduced adaptive skills, which is diagnosed before the age of 18 years. ID can originate from environmental causes and/or genetic anomalies, and its prevalence in Western countries is

How to Cite this Article:

Moysés-Oliveira M, Guilherme RS, Meloni VA, Di Battista A, de Mello CB, Bragagnolo S, Moretti-Ferreira D, Kosyakova N, Liehr T, Carnevali GM, Melaragno MI. 2015. X-Linked Intellectual Disability Related Genes Disrupted by Balanced X-Autosome Translocations.

Am J Med Genet Part B 168B:669–677.

estimated to be 1.5–2% [Leonard and Wen, 2002; Maulik et al., 2011].

Although the human X-chromosome carries only about 4% of the protein-coding genes in the human genome, X-chromosomal defects are thought to account for 8–12% of ID in males [Ropers, 2010]. X-linked forms of ID (XLID) are easily identifiable because of their characteristic inheritance pattern [Gecz et al., 2009]. This has rendered the X-chromosome an attractive target for research for the molecular causes of ID and, up to now, around 110 genes were associated with XLID [Piton et al., 2013; Hu et al., 2015].

Several approaches have been developed for the identification of genes responsible for XLID. The ascertainment of a patient with

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; **Grant number:** FAPESP # 2011/51690-1.

***Correspondence to:**

Maria Isabel Melaragno, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740 CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: melaragno.mor@epm.br

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 20 August 2015

DOI 10.1002/ajmg.b.32355

Apêndice 17 Guilherme et al., 2015

Guilherme et al. *Molecular Cytogenetics* (2015) 8:32
DOI 10.1186/s13039-015-0135-6



RESEARCH

Open Access

Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres

Roberta Santos Guilherme¹, Karen E Hermetz², Patrícia Teixeira Varella³, Ana Beatriz Alvarez Perez¹, Vera Ayres Meloni¹, M Katharine Rudd², Leslie Domenici Kulikowski⁴ and Maria Isabel Melaragno^{1*}

Abstract

Background: All human chromosomes are capped by tandem repeat (TTAGGG)_n sequences that protect them against end-to-end fusion and are essential to chromosomal replication and integrity. Therefore, after a chromosomal breakage, the deleted chromosomes must be stabilized by retaining the telomere or acquiring a new cap, by telomere healing or telomere capture. There are few reports with molecular approaches on the mechanisms involved in stabilization of 18q terminal deletions.

Results: In this study we analyzed nine patients with 18q terminal deletion identified by G-banding and genomic array. FISH using PNA probe revealed telomeric signals in all deleted chromosomes tested. We fine-mapped breakpoints with customized arrays and sequenced six terminal deletion junctions. In all six deleted chromosomes sequenced, telomeric sequences were found directly attached to the breakpoints. Little or no microhomology was found at the breakpoints and none of the breaks sequenced were located in low copy repeat (LCR) regions, though repetitive elements were found around the breakpoints in five patients. One patient presented a more complex rearrangement with two deleted segments and an addition of 17 base pairs (bp).

Conclusions: We found that all six deleted chromosomes sequenced were probably stabilized by the healing mechanism leading to a neotelomere formation.

Keywords: Terminal 18q deletion, Breakpoint sequencing, Telomere healing, Telomere capture, Neotelomere, Stabilization mechanism

Background

While interstitial deletions involve two breaks in the same chromosome arm, terminal deletions are caused by only one break leading to genomic loss. Terminal deletions of the long arm of chromosome 18 produce a highly variable phenotype. Among the most commonly reported features are growth deficiency, microcephaly, facial and limb abnormalities, genitourinary malformations, neurological abnormalities, hearing abnormalities and developmental delay with intellectual disability [1,2]. The phenotypic variability is related to the heterogeneity of the deletion size and gene content [3]. The deletions vary in size, but proximal breakpoints have been mainly described within bands 18q21.2 to 18q22.2, and does not correlate completely with the severity of clinical findings

[3-5]. The region 18q22-q23 has been implicated as critical in development impairment but a deletion in this region leads only to a susceptibility to the clinical features, since not all patients with this region deleted have the same clinical findings [4-6].

All human chromosomes are capped with around 3-20 kb of tandem repeat (TTAGGG)_n sequences and, immediately adjacent to this region, there is a segment of around 100-300 kb, the telomere-associated repeat (TAR) sequences [7]. These TAR sequences share homology with other chromosome ends [8,9]. Chromosome specific DNA sequences are located proximal to the TAR sequences [10]. Since telomeres are essential for chromosomal stabilization after breakage, the deleted chromosomes must retain the telomere or acquire a new cap [11,12]. Two main mechanisms were proposed to stabilize chromosome ends with terminal deletions: (1) telomere healing in which telomerase directly adds de novo telomeric repeats to unique nontelomeric DNA

* Correspondence: melaragno.maria@unifesp.br

¹Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Guilherme et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

4 Publicações aceitas

10.4.1- Guilherme RS, Moysés-Oliveira M, Dantas AG, Meloni VA, Colovati ME, Kulikowski LD, Melaragno MI. Position effect modifying gene expression in a patient with ring chromosome 14. J Appl Genet. 2015.

10.4.2- Dantas AG, Bortolai A; Moysés-Oliveira M, Herrero ST; Antunes AA; Costa-Carvalho BT; Meloni VA; Melaragno MI. 22q11.2 deletion syndrome due to a translocation t(6;22) in a patient conceived via in vitro fertilization. Molecular Syndromology. 2015.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Abreviaturas e símbolos gerais

AA1	Alopecia areata-tipo 1
ADNPM	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
APGAR	Índice de Apgar (do inglês, <i>Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration</i>)
CATSHL	Camptodactyly, tall stature, scoliosis, and hearing loss syndrome
CGH	do inglês, <i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CN	Comprimento ao nascer
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
CMN	Comprimento médio ao nascer
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>
del	Deleção
DFNB46	Surdez autossômica recessiva não sindrômica-46
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSAP	Poroqueratose actínica superficial disseminada
dup	Duplicação
F	Feminino
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
GARS	do inglês, <i>Gilliam Autism Rating Scale</i>
HC	Hormônio do crescimento
HPE	Holoprosencefalia
IDDM6	do inglês, <i>Insulin-dependent diabetes mellitus 6</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
M	Masculino
MIM	do inglês, <i>Mendelian Inheritance in Man</i>
PC	Perímetro cefálico
PN	Peso ao nascer
PMN	Peso médio ao nascer
PS	Polissacarídeo
RMC	Ressonância magnética de crânio
RMH	Ressonância magnética de hipófise
SNC	Sistema nervoso central
WAIS III	Escala Wechsler de Inteligência para Adultos III
WISC III	Escala Wechsler de Inteligência para Crianças III

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Achenbach TM. Manual for the Child Behavior Checklist among four- to eighteen-year-olds and 1991 Profile. Burlington, VT: University of Vermont, Department of Psychiatry (1991).

Associação Psiquiátrica Americana (APA). Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (5ª ed). Arlington, VA. American Psychiatric Publishing (2013).

Firth VF & Hurst JA. Oxford Desk Reference: Clinical Genetics. Oxford University Press (2005).

Hall JG, Froster-Iskenius UG, Allanson JE. Handbook of Normal Physical Measurements. 1st ed. New York: Oxford University Press (1989).

Schinzel A. Catalogue of unbalanced Chromosome Aberrations in Humans. 2nd ed. Berlin (2001).

Strauss E, Sherman EMH, Spreen O. A Compendium of Neuropsychological Assessment: Administration, Norms, and Commentary. 3rd ed. Oxford University Press (2006).

Wechsler D. WISC-III: Escala de Inteligência Wechsler para Crianças: Manual. 3ª ed.; São Paulo: Casa do Psicólogo (2002).

Wechsler D. WAIS-III: Manual para administração e avaliação. Manual 3ª ed. São Paulo: Casa do Psicólogo (2004).

Wilson GN, Cooley WC. Preventive Management of Children with Congenital Anomalies and Syndromes. 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press 2000:135-160.